

Charakterisierung der Interaktion von *Streptococcus pneumoniae* mit humanem Endothel

Von der Fakultät für Lebenswissenschaften
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades einer
Doktorin der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Melanie Lüttge
aus Wernigerode

1. Referentin: Privatdozentin Dr. Simone Bergmann
2. Referentin: Professorin Dr. Katharina Riedel
eingereicht am: 29.08.2011
mündliche Prüfung (Disputation) am: 17.11.2011

Druckjahr 2011

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Fakultät für Lebenswissenschaften, vertreten durch die Mentorin der Arbeit, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Tagungsbeiträge

Lüttge, M., Fulde, M., Talay, S. R., Nerlich, A., Rohde, M., Preissner, K. T., Hammerschmidt, S., Steinert, M., Mitchell, T. J., Chhatwal, G. S. & Bergmann, S. “*Streptococcus pneumoniae* induced secretion of Weibel Palade Bodies”, (Vortrag) 10th European Meeting on Molecular Biology of Pneumococcus (Europneumo), Amsterdam, Netherlands (2011).

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung.....	1
2. Einleitung	5
2.1 Die Gattung Streptokokken	5
2.2 Besondere Eigenschaften von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	6
2.3 Therapie und Prävention von Pneumokokkenerkrankungen	9
2.4 Virulenzfaktoren von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	11
2.5 Aufbau und Funktion des Lungenendothels.....	16
2.6 Weibel-Palade-bodies (WPBs)	20
2.7 Die Hauptbestandteile der Weibel-Palade-bodies	21
2.8 Ziele dieser Arbeit.....	23
3. Material & Methoden	25
3.1 Materialien und Chemikalien	25
3.1.1. Verwendete Bakterienstämme	25
3.1.2 Kulturmedien für <i>Streptococcus pneumoniae</i>	26
3.1.3 Kulturmedien für <i>Escherichia coli</i>	26
3.1.4 Kulturmedien für weitere Bakterienstämme	27
3.1.5 Eukaryotische Zellen und Zellkulturmedien.....	27
3.1.6 Verwendete Antikörper und Antiseren.....	28
3.1.7 Verwendete Kits	29
3.1.8 Reagenzien und Puffer (sofern nicht in Methoden beschrieben).....	29
3.2 Mikrobiologische Methoden.....	30
3.2.1 Kultivierung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	30
3.2.2 Konservierung von <i>Streptococcus pneumoniae</i>	31
3.2.3 Kultivierung von anderen Bakterienstämmen.....	31
3.2.4 Hitzeinaktivierung von Pneumokokken	32
3.3 Zellkulturmethoden	32
3.3.1 Kultivierung von primären Endothelzellen	32
3.3.2 Subkultivierung von primären Endothelzellen	33

Inhaltsverzeichnis

3.3.3 Kryokonservierung von primären Endothelzellen.....	33
3.3.4 Auftauen von eukaryotischen Zellen	34
3.3.5 Bestimmung der Zellzahl.....	34
3.4 Methoden zur Infektion von Endothelzellen mit Pneumokokken.....	35
3.4.1 Aussaat der Endothelzellen für Standardinfektionen	35
3.4.2 Durchführung der Zellkulturinfektion	35
3.4.3 Durchführung der Plattierungsanalysen	36
3.4.4 Weiterführende Analysen nach Zellkulturinfektion	37
3.5 Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Mikroskopie	37
3.5.1 Differentielle, indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Pneumokokken	37
3.5.2 Direkte Fluoreszenzfärbung von F-Aktin.....	38
3.5.3 Indirekte Fluoreszenzfärbung von Weibel-Palade bodies.....	39
3.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung.....	39
3.5.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)	40
3.6 Infektionsanalysen im Zweikammer-Transwell-System	41
3.7 Messung der Konfluenz von Endothelschichten	42
3.8 Präparation von Pneumokokkenmembranproteinen.....	44
3.9 Inkubation von HPMEC mit physiologischen Substanzen	45
3.10 Infektion von HPMEC mit verschiedenen Bakterienstämmen.....	46
3.11 Aufreinigung polyklonaler Antikörper.....	47
3.12 Biochemische Methoden	47
3.12.1 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> zur Quantifizierung von VWF in Zellkulturüberständen	47
3.12.2 <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)</i> zur Quantifizierung von Interleukin-8 (IL-8) in Zellkulturüberständen.....	48
3.12.3 Zytotoxizitäts-Test	49
3.13 Durchflussszytometrie	50
3.14 Mikroarray-Analyse.....	52
3.15 Real time PCR.....	53
3.16 Statistische Auswertung	54
4. Ergebnisse	55
4.1 Charakterisierung primärer, humaner Endothelzellen.....	55

4.2 In-vitro-Infektionsstudien von Pneumokokken mit humanen Endothelzellen.....	60
4.2.1 Interaktion von Pneumokokken mit Endothelzellen nach unterschiedlichen Infektionszeiten	60
4.2.2 Adhärenz und Internalisierung von Pneumokokken in HPMEC und HUVEC nach Infektion mit unterschiedlicher MOI	63
4.2.3 Visualisierung der Menge adhärenter und internalisierter Pneumokokken in HPMEC	66
4.3 Mikroarray-Analyse humaner Endothelzellen nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i>	68
4.4 Genexpressionsbestimmung von infizierten HPMEC im Vergleich zu nicht-infizierten HPMEC durch Real time PCR-Analyse	70
4.5 WPB-Bildung in humanen Lungenendothelzellen unterschiedlicher Konfluenzen und Quantifizierung des Konfluenzstatus der Zellen.....	72
4.5.1 Korrelation der WPB-Bildung mit der Konfluenz des Endothels	72
4.5.2 Quantitative Bestimmung des Konfluenzstatus von HPMEC.....	74
4.6 Korrelation der Pneumokokkenadhärenz und der WPB-Menge in HPMEC	76
4.6.1 Adhärenz von <i>S. pneumoniae</i> an WPB-positive HPMEC und WPB-negative HPMEC.....	76
4.6.2 Anteil WPB-positiver und WPB-negativer HPMEC im Infektionsverlauf mit Pneumokokken	78
4.6.3 Visualisierung der Menge adhärenter Pneumokokken und WPBs in infizierten Lungenendothelzellen	79
4.7 Quantifizierung von VWF und IL-8 Im Zellkulturüberstand von infizierten Endothelzellen.....	81
4.8 VWF-Sekretion durch Pneumokokkenmembranproteine	84
4.9 Induktion der WPB-Exozytose durch Hitze-inaktivierte Pneumokokken.....	86
4.10 Stimulierung der VWF-Sekretion durch bekapselte Serotyp 2 Pneumokokken.....	88
4.11 Stimulierung der VWF-Sekretion durch andere Bakterienstämme	89
4.12 Stimulierung der VWF-Sekretion durch sekretierte Pneumokokkenproteine.....	91
4.13 Funktion von Pneumolysin in der VWF-Sekretion.....	93
4.14 Vergleich der VWF- und IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Infektion mit Pneumokokken und Inkubation mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin	96
4.15 Zytotoxizitätsanalyse von infizierten Lungenendothelzellen	98
4.16 VWF- und IL-8-Sekretion von HPMEC nach apikaler und basaler Infektion mit Pneumokokken	102

5. Diskussion	105
5.1 Oberflächenprofile primärer Endothelzellen	105
5.2 Adhärenz der Pneumokokken an humane Endothelzellen	108
5.3 Genexpressionsanalyse humaner Lungenendothelzellen nach Infektion mit Pneumokokken	109
5.4 Korrelation der Pneumokokkenadhärenz und der WPB-Menge in HPMEC	110
5.5 Sekretion von VWF nach Infektion mit Pneumokokken	112
5.6 IL-8-Sekretion nach Infektion mit Pneumokokken.....	114
5.7 VWF-Sekretion nach Inkubation mit Pneumokokkenmembranproteinen	115
5.8 Stimulierung der VWF-Sekretion durch stark bekapselte Serotyp 2 Pneumokokken und andere Bakterienstämme	117
5.9 Funktion von Pneumolysin in der WPB-Exozytose	118
5.10 VWF- und IL-8-Sekretion von HPMEC nach apikaler und basaler Infektion mit Pneumokokken	120
6. Referenzen	123
Danksagung	139

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: <i>Streptococcus pneumoniae</i>	7
Abbildung 2: Virulenzfaktoren von Pneumokokken.....	16
Abbildung 3: Blutgefäße der Lunge.....	18
Abbildung 4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von WPBs in der Endothelzelle.....	21
Abbildung 5: Modell der Immunfluoreszenzfärbung von Pneumokokken und Aktin.....	39
Abbildung 6: Das cellZscope®.....	44
Abbildung 7: Modell der Funktionsweise der Durchflusszytometrie.....	52
Abbildung 8: Expression spezifischer Proteine und Oberflächenrezeptoren von HPMEC und HUVEC in Passage 3 und 15.....	57
Abbildung 9: Pneumokokkenadhärenz und -internalisierung in HPMEC und HUVEC nach unterschiedlichen Infektionszeiten.....	62
Abbildung 10: Interaktion von Pneumokokken mit humanen Endothelzellen nach Infektion mit unterschiedlicher MOI.....	65
Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Anzahl adhärenter und internalisierter Pneumokokken in HPMEC.....	67
Abbildung 12: Dendrogramm der Mikroarray-Analyse von Pneumokokken-infizierten HPMEC im Vergleich zu nicht-infizierten HPMEC.....	69
Abbildung 13: Expression des <i>il-8</i> -Gens in HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken.....	71
Abbildung 14: Mikroskopische Quantifizierung und Visualisierung von WPBs in HPMEC unterschiedlicher Zelldichten.....	73
Abbildung 15: Messung des elektrischen Widerstandes und der Kapazität von HPMEC während der Kultivierung.....	75
Abbildung 16: Adhärente Pneumokokken an WPB-positiven und WPB-negativen Lungenendothelzellen.....	77

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 17: Quantifizierung von WPB-positiven HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken.....	78
Abbildung 18: Visualisierung adhärenter Pneumokokken an HPMEC und WPBs in den Zellen zu verschiedenen Zeiten der Infektion.....	81
Abbildung 19: Quantitative Analyse sekretierter WPB-Bestandteile im Infektionsverlauf von HPMEC mit Pneumokokken.....	83
Abbildung 20: Quantifizierung der VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation von HPMEC mit Membranproteinen, LPS und LTA.....	86
Abbildung 21: Anteil der WPB-positiven HPMEC nach Inkubation mit Hitze-inaktivierten Pneumokokken.....	90
Abbildung 22: VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Infektion mit <i>S. pneumoniae</i> st2 und Kapsel- bzw. Pneumolysinmutanten des Serotyp 2.....	100
Abbildung 23: Quantifizierung der VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Infektion von HPMEC mit verschiedenen Bakterienstämmen.....	102
Abbildung 24: VWF-Konzentration im Zellkulturmedium nach Stimulierung von HPMEC durch sekretierte Pneumokokkenfaktoren.....	88
Abbildung 25: VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Pneumolysin....	92
Abbildung 26: Stimulierung der VWF-und IL-8-Sekretion durch Pneumokokken, Histamin, Thrombin und rekombinantem Pneumolysin.....	94
Abbildung 27: Zellviabilität und WPB-Menge von HPMEC nach Inkubation mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin.....	97
Abbildung 28: Sekretion von VWF und IL-8 nach apikaler und basolateraler Infektion von HPMEC.....	104

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Verwendete <i>Streptococcus pneumoniae</i> -Stämme.....	25
Tabelle 2: Weitere Bakterienstämme.....	25
Tabelle 3: Verwendete Endothelzellen.....	27
Tabelle 4: Zellkulturmedien für Endothelzellen.....	28
Tabelle 5: Zusammenstellung der ungekoppelten Antikörper und Antiseren.....	28
Tabelle 6: Zusammenstellung der konjugierten Antikörper und Reagenzien.....	29
Tabelle 7: Auflistung der Kits.....	29
Tabelle 8: Verwendete Reagenzien für Zellinkubationsversuche.....	29
Tabelle 9: Verwendete Antibiotika.....	30

1. Zusammenfassung

Das Gram-positive Bakterium *Streptococcus pneumoniae* besiedelt als Kommensale die Schleimhäute des menschlichen Respirationstraktes. Besonders bei Personen mit Immunschwächeprädisposition können Pneumokokken lokale Infektionen, wie Otitis media und Sinusitis, aber auch schwere invasive Erkrankungen, wie Lobärpneumonie, Sepsis oder Meningitis verursachen. Die Transmigration der Luft-Blut-Schranke in der Lunge führt zur Dissemination der Pneumokokken im vaskulären System. Das mikrovaskuläre Lungenendothel stellt einen Hauptbestandteil der Luft-Blut-Schranke dar. In der vorliegenden Arbeit wurde die Interaktion von Pneumokokken mit primären, humanen, mikrovaskulären Lungenendothelzellen (HPMEC) charakterisiert. Zunächst wurden die primären Lungenendothelzellen in einer frühen und späten Passage in durchflusszytometrischen Analysen charakterisiert. In Expressionsstudien von Differenzierungsmarkern, Oberflächenrezeptoren und Proteinen wurde das Differenzierungsprofil von HPMEC mit dem von primären, humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) verglichen. Einen essentiellen Schritt im Infektionsprozess stellt die Anheftung von *S. pneumoniae* an die Lungenendothelzellen dar. In *in-vitro*-Zellkulturinfektionsexperimenten und immunfluoreszenzmikroskopischen Analysen konnte die Adhärenz und Internalisierung eines Pneumokokken-Wildtyps und einer Pneumolysin-defizienten Mutante in HPMEC nachgewiesen werden. Mikroarray-Analysen zeigten die signifikante Änderung in der Genexpression von Pneumokokken-infizierten HPMEC im Vergleich zu nicht-infizierten HPMEC. Die Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse durch Real time PCR-Analysen bestätigte die signifikant höhere Expression von Interleukin-8 nach Infektion der HPMEC mit Pneumokokken. Endothelzellen sind entscheidend an der Hämostase und an Entzündungsreaktionen des vaskulären Systems beteiligt. Schlüsselmoleküle dieser Prozesse, wie z. B. von Willebrand Faktor (VWF) und Interleukin-8 (IL-8) werden in spezialisierten, intrazellulären Organellen, den Weibel-Palade bodies (WPB), gespeichert. In Doppelimmunfluoreszenzfärbungen konnte eine inverse Korrelation zwischen der Menge adhärenter Pneumokokken und der Menge WPB-positiver Zellen im Bezug zur Gesamtzellzahl gezeigt werden. Die inverse Korrelation der Pneumokokkenadhärenz und der Menge WPB-positiver Zellen im Verlauf einer Infektion mit dem Pneumokokken-Wildtyp und einer Pneumolysin-defizienten Mutante deutete auf eine Kontakt-abhängige WPB-Exozytose der Zellen. In ELISA-Analysen konnte die Sekretion der WPB-Komponenten VWF

und IL-8 sowohl nach Infektion mit lebenden Pneumokokken, als auch nach Inkubation mit Pneumokokkenmembranproteinen quantifiziert werden. Die Funktion der Pneumokokkenadhärenz in der Induktion der WPB-Exozytose wurde des Weiteren in VWF-ELISA-Analysen nach Infektion von HPMEC mit einem stark-bekapselten Serotyp-2-Pneumokokkenstamm untersucht. Zweikammer-Transwell-Inkubations-Analysen demonstrierten, dass neben der Adhärenz der Bakterien, sekretierte Pneumokokkenfaktoren die VWF-Sekretion stimulieren. Das Zytotoxin Pneumolysin ist ein wichtiger Virulenzfaktor von Pneumokokken. In *in-vitro*-Inkubationsexperimenten mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken und rekombinantem Pneumolysin konnte nachgewiesen werden, dass sublytische Konzentrationen von Pneumolysin die Sekretion von VWF und IL-8 induzieren. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die Induktion der VWF- und IL-8-Sekretion nach Pneumokokkeninfektion zu vergleichbaren VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand führte, wie die Stimulation der Zellen mit den physiologischen Agonisten Histamin und Thrombin. Die Sekretion von VWF und IL-8 der Lungenendothelzellen wurde sowohl nach Infektion von der apikalen, als auch von der basalen Zellseite gezeigt. Diese Untersuchungen könnten Hinweise geben auf die Induktion der WPB-Exozytose, sowohl vom Inneren des Blutgefäßes als auch vom Lungengewebe ausgehend in den Blutstrom. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit übermitteln ein detailliertes Verständnis der pathophysiologischen Interaktion von Pneumokokken mit dem humanen Lungenendothel im Verlauf einer invasiven Infektion. Die Aufklärung der Pathogenitätsmechanismen der Pneumokokken, die zur Dissemination der Bakterien ins vaskuläre System führen, ermöglicht die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie und Prävention invasiver Pneumokokkeninfektionen.

Summary

The Gram-positive bacterium *Streptococcus pneumoniae* (pneumococcus) causes severe local infections including otitis media and sinusitis and life-threatening diseases such as community-acquired pneumonia, septicaemia and meningitis. Following the course of lung infection pneumococci can enter the air-blood-barrier and disseminate in the vascular system. The lung microvasculature is covered by pulmonary endothelial cells, the natural barrier between the flowing blood and the underlying tissues. This study demonstrates the interaction of pneumococci with primary human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMEC). Primary human pulmonary endothelial cells (HPMEC) in an early and late passage were characterized in Flow cytometry analysis. Expression of different markers for endothelial cells, receptors and proteins on the surface of HPMEC were compared to primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC). Adhesion of *S. pneumoniae* to pulmonary endothelial cells is an essential first step for the establishment of colonization and invasive infections. Adherence and internalization of *S. pneumoniae* wildtype bacteria and a pneumococcal mutant deficient in the expression of cytotoxic pneumolysin were shown in *in-vitro* cell culture infection analysis and immunofluorescence microscopy. Microarray analyses monitored changes in gene expression of HPMEC induced by pneumococcal infections with a wildtype and a pneumolysin-mutant strain. Semi-quantitative gene expression analysis by Real Time RCR confirmed an up-regulation of interleukin-8 after pneumococcal infection. The vascular endothelium is characterized by its pivotal role in the control of vascular homeostasis also due to the presence of Weibel Palade bodies (WPB) as specialized intracellular storage granules for e.g. von Willebrand Factor (VWF) and interleukin-8 (IL-8). Double-label immunofluorescence staining after infection of HPMEC with pneumococci showed an inverse correlation between the number of adherent pneumococci and the amount of WPB-positive cells. The correlation between increased numbers of adherent pneumococci with subsequent reduction of WPB-positive cells provided strong evidence for pneumococcal contact-dependent WPB-exocytosis. ELISA analyses demonstrated that secretion of VWF and IL-8 was not only induced by adherence of living pneumococci to confluent HPMEC but also after incubation of HPMEC with bacterial membrane proteins. The role of pneumococcal adherence in the WPB-exocytosis was also analyzed by VWF-specific ELISA of HPMEC supernatants after infection with a highly capsulated serotype 2 pneumococcus. Results from transwell-based infection analyses demonstrated that, in addition to direct bacterial adherence, secreted pneumococcal factors induced VWF

secretion. The pore-forming cytotoxin pneumolysin is an important virulence factor of pneumococci. *In-vitro* cell culture infection analysis, performed with pneumolysin-mutants and purified pneumolysin showed that sublytical concentrations of pneumolysin stimulated secretion of VWF and IL-8. Moreover, the results showed that the effect of pneumococci on secretion of VWF and IL-8 is reaching similar levels compared to stimulation of HPMEC by physiological agonists like histamine or thrombin. The release of VWF and IL-8 was demonstrated after infection with pneumococci from both, the apical and the basal cell surfaces, which indicate a stimulation of WPB exocytosis from inside the vasculature and also from pulmonary tissue into the bloodstream. In conclusion, this study provides a detailed understanding of pathophysiological interaction of pneumococci with human endothelium during the course of invasive infections. Elucidation of pneumococcal mechanism of pathogenicity which leads to bacterial dissemination in the vascular system provides the development of new strategies to treat and prevent invasive pneumococcal infections.

2. Einleitung

2.1 Die Gattung Streptokokken

Die Gattung *Streptococcus* bezeichnet grampositive Bakterien, die mikroskopisch als runde bis ovale, unbewegliche Kokken auftreten und bevorzugt in Ketten wachsen (Patterson, 1996). Streptokokken sind Oxidase- und Katalase-negativ, bilden keine Sporen und wachsen unter fakultativ anaeroben Bedingungen (Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 1986). Sie sind in der Lage durch Fermentation von Glucose, Maltose und Sucrose unter Säurebildung Energie zu gewinnen und zählen zu den Milchsäurebakterien (*Lactobacillales*) (Madigan *et al.*, 2003). Streptokokken gehören zur Bakteriengesellschaft des Menschen. Sie kolonisieren die Haut und die Schleimhäute des oberen Atmungstraktes und können dort Infektionen wie z. B. Pharyngitis, Tonsillitis und Otitis media hervorrufen (Kayser *et al.*, 1997). In einigen Fällen lösen Streptokokken invasive und Toxin-vermittelte Erkrankungen, wie z. B. Pneumonie, Meningitis, nekrotisierende Fasciitis, Sepsis und Toxisches Schock Syndrom aus. Als Folge von Streptokokkeninfektionen können Autoimmunerkrankungen, wie z. B. rheumatisches Fieber, Glomerulonephritis und Endokarditis auftreten (Tuomanen *et al.*, 1995; Stollerman, 1997; Cunningham, 2000; Efstratiou, 2000). Die kettenbildenden Kokken wurden erstmals im Jahr 1874 von dem Chirurgen Billroth in Wundeiterpräparaten von Patienten entdeckt (Kayser *et al.*, 1997). Sie wurden daraufhin in der Literatur als Streptokokken verzeichnet. Im Jahr 1903 wurde die Gattung der Streptokokken von Schottmüller nach ihrem Hämolyseverhalten auf Blutagar unterteilt. Das Hämolyseverhalten auf bluthaltigen Nährböden ist auch heute noch ein wichtiges Kriterium zur Einordnung der Streptokokken (Brown, 1919; Facklam, 2002). Die Einteilung der Streptokokken in hämolysierende, vergrünende und nicht-hämolysierende Streptokokken wurde 1919 von Brown als α -, β - und γ -Hämolyse definiert (Brown, 1919). Die β -Hämolyse der Streptokokken bezeichnet die Fähigkeit zur vollständigen Zersetzung von Erythrozyten durch die Streptolysine O und S. *Streptococcus pyogenes* und *Streptococcus agalactiae* besitzen die Fähigkeit zur β -Hämolyse. Bei der α -Hämolyse erfolgt durch Wasserstoffperoxid der Streptokokken eine Oxidation des Eisens im Hämoglobin der Erythrozyten. Bei dieser Reaktion wird Hämoglobin zu Methämoglobin reduziert, wodurch sich das Absorptionsspektrum des Hämoglobins ändert und ein grau-grüner Hämolysehof um die

Streptokokken-Kolonien entsteht. Die α -Hämolyse ist charakteristisch für *Streptococcus pneumoniae*. γ -Hämolyse bezeichnet das Fehlen der Hämolyse (Brown, 1919; Patterson, 1996). Beispiele für γ -hämolisierende Streptokokken sind *Streptococcus bovis* und *Streptococcus salivarius*. Eine weitere Möglichkeit der taxonomischen Einteilung der Streptokokken ist die Lancefield-Typisierung (Lancefield, 1928; 1933). Diese Typisierung erfolgt auf der Basis von gruppenspezifischen Zellwandantigenen. Polymere Kohlenhydrate oder Lipoteichonsäuren bilden die Grundlage für die serologische Gruppeneinteilung. Rebecca C. Lancefield führte entsprechend der unterschiedlichen Antigene die Einteilung der Streptokokken in die Gruppen A-V ein (Lancefield, 1933).

2.2 Besondere Eigenschaften von *Streptococcus pneumoniae*

Die auch als Pneumokokken bezeichneten *Streptococcus pneumoniae* sind ovale bis lanzettförmige Bakterien, die meist als Diplokokken vorliegen. *Streptococcus pneumoniae* wurden erstmals 1881 von G.M. Sternberg als Erreger der Pneumonie und als eine eigene Art innerhalb der Gattung *Streptococcus* beschrieben (Sternberg, 1881). Nahezu zeitgleich wurden die Pneumokokken von L. Pasteur (1881) und C. Fränkel (1884) identifiziert (Hahn, Kaufmann, Falke, Ullmann, 1999). C. Fränkel führte 1886 den Namen „Pneumo-coccus“ ein (Nolte, 2009). Diagnostische Merkmale der Pneumokokken sind die α -Hämolyseaktivität auf Blutagar und die natürliche Sensitivität gegen Optochin (Nolte, 2009). Die natürliche Transformierbarkeit ist ein weiteres Kriterium, das *Streptococcus pneumoniae* von anderen Streptokokken abgrenzt (Griffith, 1928; Avery, 1942). Ein weiteres Merkmal der Pneumokokken ist die Polysaccharidkapsel. Bei der Kultivierung von stark bekapselten Stämmen auf Blutagar zeigen sich schleimig-aussehende Kolonien, die als s (smooth)-Form bezeichnet werden. Schwach bekapselte Stämme weisen eine rauhe r (rough)-Form auf (Watson und Musher, 1990). Auf Grund der unterschiedlichen chemischen Struktur der Kapselpolysaccharide von Pneumokokken konnten bisher 91 Serotypen unterschieden werden (Lund und Henrichsen, 1978; AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Die Serotypisierung der Pneumokokken erfolgt nach der Neufeldschen Quellungsreaktion (Neufeld, 1902), bei der eine Agglutination mit Antiserum desselben Serotypes zur Einordnung verwendet wird. Die Virulenz des Serotyps hängt von der Ausprägung und Struktur der Polysaccharidkapsel ab. Bekapselte Stämme zeigen eine um 10^5 stärkere Virulenz als unbekapselte Stämme (Watson und Musher *et al.*, 1990). Besonders stark virulent sind die Pneumokokken-Serotypen 1, 2, 3, 6A, 6B, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23F (Tuomanen *et al.*, 1995; Rodgers *et al.*, 2009). Im

Gegensatz konnte gezeigt werden, dass bekapselte Stämme von *S. pneumoniae* eine verminderte Adhärenz an eukaryotische Zellen zeigen (Talbot *et al.*, 1996).

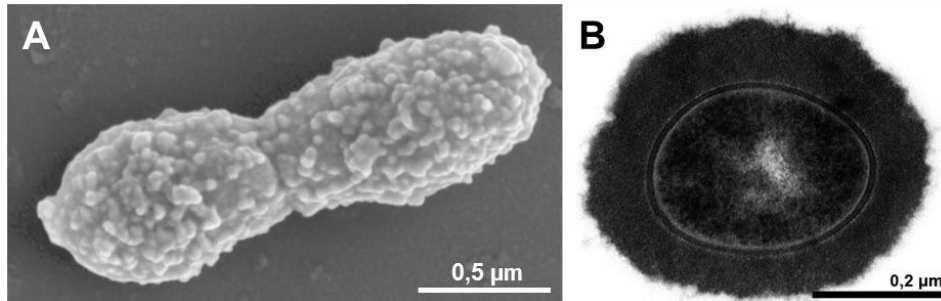


Abbildung 1: *Streptococcus pneumoniae*. A) Elektronenmikroskopische Aufnahme von *S. pneumoniae* A66 (Serotyp 3) mit ausgeprägter Polysaccharidkapsel B) Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Schnittes durch ein stark bekapseltes Serotyp 2-Isolat *S. pneumoniae* D39 (Prof. Dr. M. Rohde, HZI Braunschweig).

Das natürliche Habitat der Pneumokokken ist der menschliche Nasopharynx. *S. pneumoniae* besiedelt asymptomatisch die Schleimhäute des oberen respiratorischen Atmungstraktes von circa 50% der gesunden Menschen (Gray *et al.*, 1980; Garcia-Rodriguez and Fresnadillo-Martinez, 2002). Die Bakterien werden meist durch Tröpfcheninfektion von Mensch zu Mensch übertragen (Hahn, Kaufmann, Falke, Ullmann, 1999). Sie kolonisieren im Nasopharynx und besiedeln von dort aus die Nasennebenhöhlen und Bronchien (Gray *et al.*, 1980; Garcia-Rodriguez and Fresnadillo-Martinez, 2002). Eine Pneumokokkenbesiedelung kann durch mehrere Serotypen gleichzeitig erfolgen und im Lauf des Lebens wiederholt vorkommen (Nielsen und Henrichsen, 1992; Sankilampi *et al.*, 1997). Nach der Besiedlung der Nasennebenhöhlen kann *S. pneumoniae* über die Eustachische Röhre in das Mittelohr gelangen und typische lokale Infektionen wie Nasennebenhöhlenentzündungen (Sinusitis) und Mittelohrentzündungen (Otitis Media) auslösen (Lynch und Zhanel, 2010). Pneumokokken können vom oberen Atmungstrakt in die Lunge disseminieren (Loda *et al.*, 1975; Boulnois, 1992; Ekdahl *et al.*, 1997). Im Fall einer Immunschwäche durch eine Krankheit oder eine bereits vorhandene Infektion können die Pneumokokken über die Luft-Blut-Schranke in das Blutsystem des Menschen gelangen. Die Erreger können sich dann über den Blutkreislauf im Organismus ausbreiten und eine Sepsis auslösen (Gray *et al.*, 1979). Bei bis zu 25% aller Pneumokokken-Pneumonien erfolgt eine Dissemination der Bakterien in den Blutstrom (Lee *et al.*, 1991). Überwinden die Pneumokokken die Blut-Hirn-Schranke kann sich eine Meningitis entwickeln (Cartwright, 2002).

Die höchste Inzidenz invasiver Pneumokokkeninfektionen verbunden mit den höchsten Letalitätsraten verzeichnen die Altersgruppen der unter 2- und der über 65-jährigen, sowie Personen mit Immunschwäche-Prädisposition (Robert-Koch-Institut, 2001; Austrian *et al.*, 1977; Gray *et al.*, 1979; Garcia - Leonie *et al.*, 1992). Pneumokokkeninfektionen treten oft als Sekundärinfektionen nach vorausgegangenen viralen Infekten des oberen Atmungstraktes auf (Benner *et al.*, 1974; Seki *et al.*, 2004; Kukavica-Ibrulj *et al.*, 2009). Nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation (WHO) sind Infektionen mit Pneumokokken eines der Hauptgesundheitsprobleme weltweit (WHO, 2007). *S. pneumoniae* ist der häufigste Erreger von ambulanten Pneumonien und Hauptverursacher der akuten Otitis media-Erkrankungen bei Kindern unter 3 Jahren (Burman *et al.*, 1985; Rodgers *et al.*, 2009). Die meisten Mittelohrinfektionen werden dabei von Stämmen der Serotypen 3, 6A, 6B, 9V, 14, 19A, 19F und 23F hervorgerufen (Rodgers *et al.*, 2009). Pneumokokken gelten außerdem als eine der wichtigsten Ursachen für bakterielle Hirnhautentzündung und Sepsis bei Erwachsenen (Tuomanen *et al.*, 1995, WHO, 2007). Weltweit erkranken jährlich über 10 Millionen Menschen an Pneumokokkeninfektionen (O'Brien *et al.*, 2009; Lynch und Zhanel, 2010). Die WHO schätzte 2005 die jährlichen Todesfälle aufgrund von Pneumokokken-Erkrankungen auf 1,6 Millionen (WHO, 2007). Dabei werden bis zu 1 Million Todesfälle Kindern unter 5 Jahren, die meist aus Entwicklungsländern stammen, zugeordnet (WHO, 2007). Auch in industriell hochentwickelten Ländern wie Deutschland oder den USA sind Pneumokokken die Hauptursache invasiver Erkrankungen, wie bakteriämischer Pneumonie, Sepsis oder Meningitis (Robert-Koch-Institut, 2010). Schätzungen zufolge sterben 4.000 bis 8.000 Menschen in Deutschland pro Jahr an invasiven Pneumokokkeninfektionen (Robert-Koch-Institut, 2010). Die Serotypen 1, 4 und 7F sind besonders häufig mit invasiven Erkrankungen assoziiert, während bei Infektionen mit den Serotypen 3, 6B und 19F sehr hohe Mortalitätsraten verzeichnet worden (Sandgren *et al.*, 2005). Die Serotypen 6B, 14, 19F und 23F besiedeln sowohl als harmlose Kommensale als auch als pathogene Erreger die Nasenrachenräume von Kindern (Sandgren *et al.*, 2005). Die hochgradig invasiven Stämme der Pneumokokken sind oft einzelne Bakterienklone gleicher Serotypen, die über Transformation und Rekombination unterschiedliche Pathogenitätsprofile erworben haben (Henriques-Normark *et al.*, 2008). Durch die erhöhte Mobilität unseres hochtechnisierten Zeitalters und der weltweit ausgebauten Infrastruktur überschreiten die Klone sehr schnell Länder- und Kontinentgrenzen und breiten sich aus (Henriques-Normark *et al.*, 2008).

2.3 Therapie und Prävention von Pneumokokkenkrankungen

Die Behandlung von Pneumokokkenkrankungen erfolgt durch Antibiotikagabe. Bei Otitis media und Pneumonien werden hauptsächlich β -Lactam-Antibiotika, wie Penicilline eingesetzt (Musher, 1992). Die Antibiotikatherapie der Pneumokokkenkrankungen wird durch die zunehmende Resistenzbildung der Erreger gegenüber β -Lactam-Antibiotika erschwert (Reinert, 2009). Die Penicillin-Resistenz der Pneumokokken beruht auf der Expression von modifizierten Penicillin-Bindungsproteinen (PBP) (Maurer *et al.*, 2007; Reinert, 2009). In den letzten Jahren ist bei den vorherrschenden Pneumokokkenisolaten neben der Zunahme von Resistenzen gegenüber Penicillin auch eine Resistenzentwicklung gegen Makrolid- oder Trimethoprim-Antibiotika zu beobachten (Reinert, 2009). Makrolid-Antibiotika binden an die 50 S Ribosomenuntereinheit der Bakterien und verhindern die Translation der mRNA. Die Methylierung der 23S rRNA oder die Expression von Effluxpumpen führt zur Resistenzentwicklung gegen Makrolide. Die Trimethoprim-Sulfonamid Resistenz wird durch eine veränderte Dihydrofolat-Reduktase vermittelt (Reinert, 2009; Van der Linden *et al.*, 2007). In Europa wurden resistente Pneumokokkenisolate hauptsächlich in Spanien, Frankreich und Ungarn verzeichnet (Reinert *et al.* 2005). Weltweit weisen zurzeit bis zu 40% der Pneumokokkenisolate multiple Antibiotikaresistenzen auf, wobei vor allem bei klinischen Isolaten der Serotypen 6A, 6B, 9V, 14, 19F und 23F eine Zunahme der Resistenzen verzeichnet wird (Lynch and Zhanel, 2010; Ruckinger *et al.*, 2009). Bei Resistenz des Pneumokokkenstammes oder einer Allergie des Patienten gegen Penicillin, stehen das Ansamycin-Antibiotikum Rifampicin oder das Glycopeptid-Antibiotikum Vancomycin zur Verfügung (Grimwood *et al.*, 1997; Jacobs, 2004). Die Ursachen von Antibiotikaresistenzen sind vielfältig. Einerseits führt die unkontrollierte und häufig wiederholte Einnahme von Breitband-Antibiotika zu einer Selektion von multiresistenten Stämmen, andererseits können sich Resistenzen durch die hohe Mobilität der Bevölkerung überregional ausbreiten (Reinert, 2009). Eine weitere Ursache der Entwicklung von multiplen Antibiotikaresistenzen ist der „Pneumokokken-Brudermord“. Pneumokokken exprimieren Bakteriozide und Bakteriolyse, die zur Lyse von vor allem nicht-kompetenten Pneumokokken führen (Havarstein *et al.*, 2006). Die Lyse von Bakterien der eigenen Art ermöglicht eine selektive und effiziente Transformation von DNA. Aufgrund der natürlichen Transformierbarkeit der Pneumokokken wird der Austausch und eventuelle Neukombination von Genen durch horizontalen Gentransfer erleichtert (Havarstein *et al.*, 2006). Darüber hinaus gehört *S. pneumoniae* zu den Bakterienarten, die eine hohe homologe Rekombinationsrate aufweisen. Diese Mechanismen fördern die genetische Diversität der

Pneumokokken und können zum Austausch von Resistenzgenen führen (Claverys *et al.*, 2007).

Um Infektionen durch Pneumokokken vorzubeugen, wurde bereits vor circa 30 Jahren ein Kapselpolysaccharid-basierter Impfstoff gegen Pneumokokken (Pneumovax 23™) entwickelt (Austrian *et al.*, 1976). Der Impfstoff enthält 23 Kapselantigene der zur damaligen Zeit am häufigsten vorkommenden Serotypen bei Infektionen in Europa und den USA (Pneumovax 23™, Merck, 1996). Kapselpolysaccharide vermitteln eine T-Zell-unabhängige-Immunantwort, die in den ersten zwei Lebensjahren noch nicht entwickelt ist (Robert-Koch-Institut, 2001). Da die Schutzwirkung des Polysaccharid-Impfstoffes insbesondere bei Kleinkindern begrenzt ist und auch bei Erwachsenen nur ein sehr eingeschränktes Immungedächtnis aufbaut, wurde die Entwicklung eines proteinbasierten Impfstoffes angestrebt (Lee *et al.*, 1991; Pletz *et al.*, 2008; Ruckinger *et al.*, 2009). Die Konjugation eines Kapselantigens an ein Trägerprotein vermittelt eine T-Zell-abhängige Immunantwort (Robert-Koch-Institut, 2001). Die T-Zell-abhängige Immunantwort induziert das immunologische Gedächtnis und kann auch Kleinkinder langfristig gegen eine Infektion durch Pneumokokken schützen (Lee *et al.* 1991). Im Jahr 2001 wurde in Deutschland ein Polysaccharid-Konjugatimpfstoff mit der Bezeichnung Prevnar® (PNCRM7) zugelassen. Bei diesem Impfstoff sind die Kapselpolysaccharide von sieben *S. pneumoniae*-Serotypen, (4, 6B, 9V, 14, 18C, 19F, 23F), die bei 70 % der Pneumokokkeninfektionen bei Kindern nachgewiesen wurden, chemisch an eine nichttoxische Variante des Diphtherietoxins CRM197 als Trägerprotein gekoppelt (Rennels *et al.*, 1998; Tan, 2002). Weltweit sind etwa 20 Serotypen für circa 70 % der invasiven, durch *S. pneumoniae* verursachten Erkrankungen verantwortlich (Prato *et al.*, 2010). In unterschiedlichen geographischen Regionen dominieren verschiedene Serotypen. Der heptavalente Konjugatimpfstoff Prevnar® führte zu einem Rückgang der invasiven Pneumokokkenerkrankungen in Deutschland und den USA (Ruckinger *et al.*, 2009). Der Impfstoff vermittelt jedoch nur einen Immunschutz gegen die beinhalteten Serotypen. Die Einführung des Konjugat-Vakzins beeinflusste jedoch den Anteil der nicht im Impfstoff enthaltenen Serotypen an invasiven Erkrankungen. Seit dem vermehrten Einsatz des Konjugat-Vakzins konnte eine Verschiebung der infektionsauslösenden Serotypen in Richtung der nicht im Impfstoff-enthaltenen Serotypen beobachtet werden (Posfay-Barbe, 2004; Reinert, 2009). Seit Ende 2009 ist Prevnar 13® in Deutschland zur Pneumokokkenimpfung von Kindern bis fünf Jahren zugelassen (Nuorti and Whitney, 2010). Der Impfstoff ist im Vergleich zu Prevnar® gegen weitere sechs Pneumokokkenserotypen gerichtet (1, 3, 4, 5, 6A, 6B, 7F, 9V, 14, 18C, 19A, 19F und 23F) und deckt ein breiteres Serotyp-Spektrum ab (Prato *et al.*, 2010). Darüber hinaus ist seit 2009 der 10-valente Pneumokokken-Impfstoff mit der Bezeichnung Synflorix in Deutschland zugelassen (Knuf und Kieninger, 2010). Dieser Konjugatimpfstoff unterscheidet sich in seiner

Zusammensetzung wesentlich vom 7-valenten bzw. 13-valenten Konjugatimpfstoff. Als Trägerprotein wurde bei 8 von 10 im Impfstoff enthaltenen Serotypen das Protein D des Bakteriums *Haemophilus influenzae* verwendet. Um einen möglichst umfassenden Schutz vor allen *S. pneumoniae* Serotypen zu erhalten, fokussiert sich die Impfstoffentwicklung auf Serotyp-unabhängige, ubiquitär vorhandene, immunogene Oberflächenproteine. Neben der Suche nach potentiellen Vakzin-Antigenen ist das detaillierte Verständnis der Mechanismen im Verlauf eines Infektionsprozesses für die Beurteilung eines potentiellen Impfstoffes notwendig.

2.4 Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae*

An der Kolonisierung, Persistenz und Dissemination von Pneumokokken in verschiedene Gewebe im Wirt ist eine Vielzahl von Virulenzfaktoren beteiligt (Salyers und Whitt, 1994). *Streptococcus pneumoniae* verfügt über ein breites Spektrum an Virulenzfaktoren mit verschiedenen Funktionen (Hammerschmidt, 2006). Zu den Virulenzfaktoren von Pneumokokken gehören Proteine, Enzyme, Toxine und Kohlenhydratstrukturen, die auf der Bakterienoberfläche verankert sind oder in die Umgebung freigesetzt werden (Jedrzejewski *et al.*, 2001; Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Sie schützen *S. pneumoniae* vor dem Immunsystem des Wirtes oder vermitteln die Adhärenz an Wirtszellen (Salyers und Whitt, 1994). Einer der wichtigsten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* ist die Polysaccharidkapsel. Sie umgibt die Zellwand der Bakterien und besteht aus unterschiedlichen Mono-, Di und Trisacchariden, Aminosukker, Acetyl-, und Phosphorylgruppen und diese sind über Phosphodiesterbindungen miteinander verknüpft (Austrian *et al.*, 1981; van Dam *et al.*, 1990). Die verschiedenen Serotypen der Pneumokokken werden aufgrund der Zusammensetzung der Kapselpolysaccharide unterschieden (Lund und Henrichsen, 1978; AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995). Die Ausprägung und Zusammensetzung der Kapsel bestimmt in hohem Maße die Virulenz des Pneumokokken-Serotyps (Watson und Musher *et al.*, 1990). Bekapselte Stämme sind in der Regel hoch virulent, während unbekapselte Stämme meist avirulent sind (Watson und Musher, 1990). Die Kapselpolysaccharide schützen die Pneumokokken vor Phagozytose durch polymorphkernige Lymphozyten und inhibieren die Aktivierung der alternativen Komplementkaskade (Fine, 1975). Die Kapsel limitiert die Reinigungsfunktion der humanen Schleimhäute, wodurch die Kolonisierung der Gewebeoberflächen mit Pneumokokken erhöht wird (Nelson *et al.*, 2007). Darüber hinaus konnte im Verlauf einer Infektion bei einigen

Serotypen eine spontane Phasenvariation in der Kapselexpression beobachtet werden. Sie führt zu einer opaken oder transparenten Erscheinungsform der Kolonien (Weiser *et al.*, 1994). Pneumokokken mit transparentem Phänotyp bilden eine geringere Menge an Kapselpolysaccharid. Bakterielle Oberflächenproteine sind dann nicht mehr von Polysacchariden maskiert und können die Anheftung der Bakterien an mukosale Epitheloberflächen fördern (Weiser *et al.*, 1994). Opaque Varianten weisen einen höheren Gehalt an Kapselpolysacchariden auf, exprimieren aber eine geringere Menge an Teichonsäuren und dadurch auch Phosphorylcholin (Kim und Weiser, 1998). Phosphorylcholin stellt einen Verankerungspunkt für cholinbindende Oberflächenproteine von Pneumokokken dar, so dass eine verringerte Oberflächenpräsenz von einigen Virulenzfaktoren die Folge ist. Pneumokokken mit opakem Phänotyp zeigten eine höhere Virulenz in systemischen Infektionen (Kim und Weiser, 1998; Weiser *et al.*, 1994; Overweg *et al.*, 2000; Weiser *et al.*, 2001). Ergänzend wurde in elektronenmikroskopischen Studien gezeigt, dass Pneumokokken in direktem Kontakt mit eukaryotischen Lungenzellen deutlich weniger bekapselt sind als Pneumokokken ohne direkten Zellkontakt (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Darüber hinaus zeigten bekapselte Stämme von *S. pneumoniae* eine verminderte Adhärenz an eukaryotische Zellen (Talbot *et al.*, 1996).

Ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von Pneumokokken ist Pneumolysin, ein thiol-aktiviertes porenbildendes Toxin mit einem Molekulargewicht von 52,8 kDa (Marriott *et al.*, 2008). Es wird im Zytosol von allen klinischen Pneumokokkenisolaten exprimiert und beim Wachstum der Bakterien und nach Autolyse freigesetzt (Marriott *et al.*, 2008). Für die Autolyse der Pneumokokken ist das Autolysin N-Acetylmuramyl-L-Alanin-Amidase (LytA) von Bedeutung. Das Autolysin ist über Cholinreste von Lipoteichonsäuren in der Zellwand verankert (Holtje und Tomasz, 1975). Nach Erreichen der stationären Wachstumsphase der Pneumokokken, bei Nährstoffmangel oder durch Antibiotikaeinwirkung kommt es zur Reduktion der Zellwandbiosynthese. Aktiviertes Autolysin hydrolysiert die Peptidbindung zwischen Alanin und N-Acetylmuraminsäure (Berry *et al.*, 1989; Paton *et al.*, 1993). Die Autolyse der Pneumokokken ermöglicht die Freisetzung zytosolischer und zellwandassoziiierter Virulenzfaktoren, wie z. B. Pneumolysin (Johnson, 1977; Lock *et al.*, 1988). Eine Autolyse-unabhängige Freisetzung von Pneumolysin wird ebenfalls diskutiert (Balachandran *et al.*, 2001). Pneumolysin bindet an das Cholesterin der Plasmamembranen von Wirtszellen und induziert Transmembranporen (Gilbert *et al.*, 1999). Die Transmembranporen führen zur Lyse der Wirtszelle (Johnson *et al.*, 1980; Rubins *et al.*, 1993). Pneumolysin kann bereits in sublytischen Mengen die Zilienmotilität von nasopharyngealen Epithelien inhibieren (Steinfurt *et al.*, 1989; Feldman *et al.*, 1990). Das Toxin wirkt neurotoxisch und induziert im Verlauf einer Pneumokokkenmeningitis die Apoptose der Hirnzellen. Dies schädigt die ependymalen Zilien des Hirns (Rubins *et al.*, 1998; Braun *et al.*, 2002). In geringeren Mengen stimuliert

Pneumolysin die Produktion von Zytokinen wie TNF- α und Interleukin-1 β in humanen Monozyten (Houldsworth *et al.*, 1994). Pneumolysin verringert die Neutrophilenmigration und inhibiert die Lymphozytenproliferation und Antikörpersynthese (Paton und Ferrante, 1983). Darüber hinaus bewirkt Pneumolysin die Stimulierung des Komplementsystems über die Bindung an die Fc-Fragmente von Antikörpern (Paton *et al.*, 1993).

Komponenten der Zellwand von Pneumokokken sind bei Entzündungsprozessen im Verlauf einer Pneumokokkeninfektion und bei der Adhärenz der Pneumokokken an humane Endothelzellen beteiligt (Geelen *et al.*, 1993). Die Zellwandpolysaccharide von Pneumokokken bestehen aus Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren und stimulieren die Produktion von Interleukin-1 bei humanen Monozyten (Riesenfeld-Orn *et al.*, 1989). Ein wichtiger Bestandteil der Teichonsäuren und Lipoteichonsäuren der bakteriellen Zellwand von *S. pneumoniae* ist das Phosphorylcholin (Alonso De Valesco *et al.*, 1995). Das Phosphorylcholin vermittelt die Assoziation von Proteinen an der Bakterienoberfläche (sog. Cholinbindungsproteine). Die Gruppe der Cholinbindungsproteine von Pneumokokken binden nicht-kovalent über Cholinbindungsdomänen an die Phosphorylcholingruppen der Lipoteichonsäuren auf der Pneumokokkenzellwand (Yother und White, 1994). Ein Beispiel eines Cholinbindungsproteins ist das *pneumococcal surface protein C* (PspC) (Bergmann and Hammerschmidt, 2006). Die Interaktion zwischen PspC und dem humanen polymeren Immunglobulinrezeptor (pIg-R) führt zur Internalisierung der Pneumokokken in humane Lungenepithelzellen (Agarwal *et al.*, 2009). PspC interagiert mit dem Lamininrezeptor auf der Oberfläche von Hirnendothelzellen und fördert die bakterielle Adhärenz (Orihuela *et al.*, 2009; Hammerschmidt *et al.* 2007). Darüber hinaus stimuliert PspC die IL-8 Produktion von humanen Lungenepithelzellen und beeinflusst damit die inflammatorische Stimulierung des Immunsystems (Madsen *et al.*, 2000). Das Phosphorylcholin vermittelt nicht nur die Proteinassoziation an der Bakterienoberfläche, sondern interagiert auch mit dem Rezeptor für den *platelet activating factor* (PAF) (Cundell *et al.* 1995; Cundell *et al.* 1996). Der PAF-Rezeptor ist an der Adhäsion von Pneumokokken an Endothelzellen, sowie der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke beteiligt (Cundell *et al.*, 1996; Ring *et al.*, 1998).

Die Anheftung von *S. pneumoniae* an Wirtsstrukturen stellt einen wichtigen initialen Schritt bei einer Infektion dar. Für die Adhärenz von Pneumokokken an Epithel- und Endothelzellen sind insbesondere Faktoren der Bakterienoberfläche von Bedeutung. Die meisten Virulenzfaktoren von *S. pneumoniae* sind Oberflächenproteine, die direkt oder indirekt mit humanen Zellen interagieren (AlonsoDeVelasco *et al.*, 1995; Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Ein gut untersuchtes Protein auf der Pneumokokkenoberfläche ist das *pneumococcal surface adhesin A* (PsaA). Es gehört zur Gruppe der Lipoproteine und ist in das Mangan-Transport-System als substrat-bindendes Protein involviert (Dintilhac, Alloing

et al. 1997). PsaA vermittelt die Adhärenz und Invasion von *Streptococcus pneumoniae* in eukaryotische Zellen (Bergmann and Hammerschmidt, 2006). Als Rezeptor auf der Zelloberfläche wurde das Zelladhäsionsmolekül E-Cadherin identifiziert (Anderton *et al.*, 2007). PsaA ist aufgrund seiner Serotyp-unabhängigen Expression und seiner hoch immunogenen Wirkung ein potentiell Vakzin-Antigen und wird in einigen Impfstoffstudien getestet (Rajam *et al.*, 2008). Auf der Oberfläche von *S. pneumoniae* werden Proteine exprimiert, die ein C-terminales LPXTG-Motiv enthalten. Das Protein ist über das LPXTG-Motiv kovalent im Peptidoglykangerüst der Bakterienzellwand verankert (Bergmann and Hammerschmidt, 2006). Die Neuraminidase A (Nan A) ist ein proteolytisch aktives Protein der kovalent-verankerten Proteine, das direkt mit Endothelzellen interagiert. Die Neuraminidase A spaltet N-acetylneuraminsäure von Glycolipiden, Lipoproteinen und Oligosacchariden und vermittelt die Adhärenz und Internalisierung von Pneumokokken an Hirnendothelzellen (Camara *et al.*, 1994; Uchiyama *et al.*, 2009; Banerjee *et al.*, 2010).

Streptococcus pneumoniae exprimiert des Weiteren oberflächenassoziierte Virulenzfaktoren, die keine bekannten Verankerungsmotive enthalten (Bergmann *et al.*, 2001; Bergmann and Hammerschmidt, 2006). Diese Faktoren üben wichtige Funktionen im Metabolismus der Pneumokokken aus. Die Glykolyse-Enzyme Enolase und Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) sind sowohl im Zytoplasma, als auch auf der Pneumokokkenoberfläche lokalisiert (Bergmann *et al.*, 2001). Pneumokokken binden über extrazelluläre Enolase und die extrazelluläre GAPDH humanes Plasminogen, das Proenzym der Serin-Protease Plasmin (Bergmann *et al.*, 2001). Plasmin ist ein Schlüsselenzym der Fibrinolyse und an der Homeostase und Degradation von Komponenten der extrazellulären Matrix, wie Vitronectin und Laminin beteiligt (Saksela, 1985; Lähdenmäki *et al.*, 2001). Aktives Plasmin aktiviert darüber hinaus weitere Proteasen, z. B. Kollagenasen. Das aktive Plasmin entsteht durch die proteolytische Spaltung des Zymogens Plasminogen. Die Proteolyse erfolgt durch physiologische Plasminogenaktivatoren wie den Urokinasetyp-Plasminogenaktivator (u-PA) und den Gewebetyp-Plasminogenaktivator (t-PA), der besonders bei Entzündungsreaktionen aus Gefäßendothelien freigesetzt wird (Preissner und Chhatwal, 1999; Lähdenmäki *et al.*, 2001). Durch die Bindung an Plasminogen verfügen Pneumokokken über einen Mechanismus, Strukturen der extrazellulären Matrix und Thrombozytenthromben zu degradieren (Bergmann and Hammerschmidt, 2006). Pneumokokken nutzen die proteolytische Aktivität des Wirtes, um in tiefere Gewebeschichten vorzudringen (Bergmann *et al.*, 2005).

Neben der direkten Adhärenz an humane Zellen findet bei Pneumokokken eine Interaktion mit Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM) statt. Die extrazelluläre Matrix besteht aus fibrillären und netzwerkbildenden Kollagenen und unverzweigten Glykosaminoglykanen

(Alberts *et al.*, 1994). Darüber hinaus enthält die EZM viele verschiedene Proteine, wie z. B. Fibronectin, Vitronectin oder Laminin, die Interaktionen zwischen Zelloberflächen und anderen Matrixkomponenten vermitteln. Die Verankerung der Zelle auf der Basalmembran erfolgt über Integrine, die als Hemidesmosomen oder fokale Adhäsionskontakte organisiert sind (Alberts *et al.*, 1994). Eine Vielzahl von bakteriellen Adhäsinen von Gram-positiven Bakterien interagiert im Infektionsverlauf mit verschiedenen Komponenten der EZM (Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Zu diesen Kontaktmolekülen gehören Fibronectin, Vitronectin, Fibrinogen, Integrine und Thrombospondin (Preissner und Chhatwal, 1999). Pneumokokken exprimieren Adhäsine, die spezifisch mit Fibronectin und Vitronectin interagieren (Kostrzynska and Wadstrom, 1992; Holmes *et al.*, 2001; Bergmann und Hammerschmidt, 2006; Bergmann *et al.*, 2009). Fibronectin und Vitronectin sind multifunktionelle Glykoproteine, die in der EZM und im Blutplasma nachweisbar sind (Preissner *et al.*, 1985). Das nicht-klassisch verankerte oberflächenlokalisierte Protein *pneumococcal adherence and virulence factor A* (PavA) konnte als Adhäsine für das extrazelluläre Matrix-Protein Fibronectin identifiziert werden (Holmes *et al.*, 2001). Studien von Bergmann und Kollegen demonstrierten, dass Pneumokokken über Vitronectin an $\alpha_v\beta_3$ -Integrine von humanen Endothelzellen binden (Bergmann *et al.*, 2009). Diese Interaktion förderte die Internalisierung der Pneumokokken in humane Endothelzellen (Bergmann *et al.*, 2009).

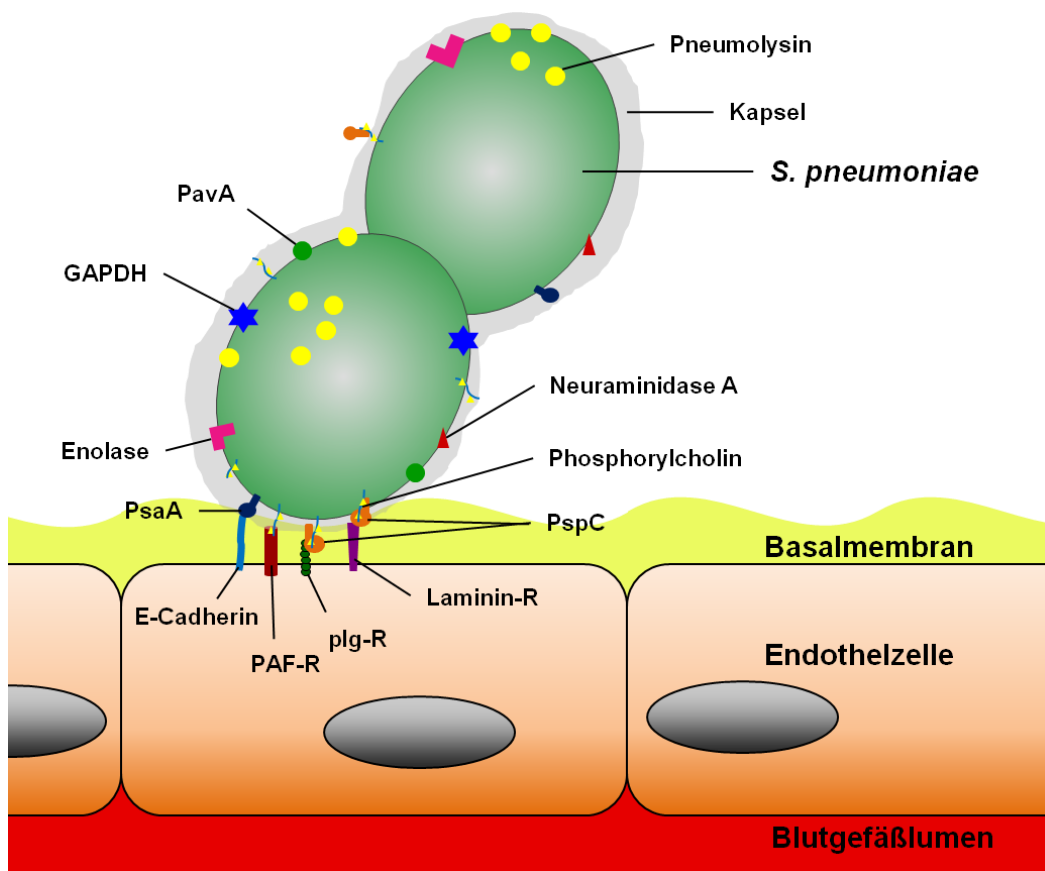


Abbildung 2: Virulenzfaktoren von Pneumokokken. Schematisierte Darstellung der im Text beschriebenen Virulenzfaktoren von *Streptococcus pneumoniae* und bekannte Interaktionen mit Oberflächenmolekülen von Endothelzellen (modifiziert aus Bergmann und Hammerschmidt, 2006)

2.5 Aufbau und Funktion des Lungenendothels

Das Endothel bildet die innere Auskleidung von Blut- und Lymphgefäßen und damit eine semipermeable Grenzfläche zwischen dem zirkulierenden Blut bzw. der Lymphflüssigkeit und der Gefäßwand (Sumpio *et al.*, 2002). Im humanen, adulten Körper besteht das Endothel aus circa 10 Billionen (10^{13}) Zellen und wiegt circa 1 kg (Augustin *et al.*, 1994). Bis in die sechziger Jahre galt das Endothel als eine einreihige Zellschicht mit der Funktion, die Diffusion von Makromolekülen des vorbeifließenden Blutes in die darunter liegenden Gewebeschichten zu verhindern (Florey, 1966). In den letzten Jahrzehnten sind die

vielfältigen Funktionen des Endothels näher untersucht worden. Endothelzellen sind an der Hämostase, Entzündungsreaktionen, der Kontrolle der vaskulären Tonizität, der Angiogenese und der Wundheilung beteiligt (Goligorsky *et al.*, 2009). Die Sprossung neuer Blutgefäße (Angiogenese) wird vom Endothel initiiert. Endothelzellen und hämopoetische Zellen entwickeln sich aus denselben Vorläufern, den Hämangioblasten, Blasten-ähnlichen bipotenten Zellen (Choi *et al.*, 1998). Das Endothel stellt als homogene Zellschicht nicht nur eine bedeutende Barrierefunktion dar, sondern reguliert aktiv die Permeabilität und die Adhäsion von Zellen (Pries *et al.*, 2000; Pries and Kuebler, 2006). Das Endothel kontrolliert den Blutdruck durch Regulation von Vasokonstriktion und Vasodilation, ist maßgeblich an Entzündungsprozessen beteiligt und reguliert Gerinnungsprozesse (Sumpio *et al.*, 2002).

Das Endothel des Blutgefäßsystems wird in drei Arten unterteilt. 1. Das Endothel der Arterien umfasst makrovaskuläre Gefäße, die das Blut vom Herzen wegführen. 2. Das Endothel der Venen sind makrovaskuläre Gefäße, die das Blut zum Herzen hinführen. 3. Beim Endothel der Kapillaren handelt es sich um mikrovaskuläre Gefäße, die Arterien und Venen miteinander verbinden (Moll, 2006). Eine Blutkapillare hat einen Durchmesser von 5-15 µm und vermittelt den Austausch von gelösten Substanzen und Körperflüssigkeit zwischen dem Blut und dem umgebenden Gewebe (Moll, 2006). Das Endothelium der Kapillare besteht aus sehr flachen Endothelzellen. Um die Endothelzellen befindet sich die Basalmembran, eine reversibel, dehnbare Schicht von 30-60 nm Dicke (Moll, 2006). Blutkapillare werden aufgrund des Endothelaufbaus in verschiedene Arten unterteilt. Es werden Kapillare mit geschlossenem Endothel (kontinuierliches Endothel), Kapillare mit gefensterter Endothel (fenestriertes Endothel) und Kapillare mit interzellulären Lücken (diskontinuierliches Endothel) unterschieden (Moll, 2006). Der Aufbau und die Funktion der Kapillare sind Organspezifisch (Aird, 2007). In der menschlichen Lunge sind die Lungenbläschen (Alveolen) von einem flachen, einschichtigen Alveolarepithel ausgekleidet (Moll, 2006). Die Blutkapillare befinden sich als Netzwerk um das Alveolarepithel der Alveolen (siehe Abb. 3 A) (Moll, 2006; Aird, 2007). Die Basalmembranen von Alveolen und Kapillaren sind verschmolzen (siehe Abb. 3 B und C) (Moll, 2006). Das Alveolarepithel, die Basalmembran und das Kapillarendothel bilden die Luft-Blut-Schranke (siehe Abb. 3 C). Die Luft-Blut-Schranke ist circa 0,5 µm dick (Moll, 2006). Die Endothelzellen der Luft-Blut-Schranke bilden ein kontinuierliches Endothel und sind über viele Zellverbindungen (*tight junctions*) miteinander verbunden (Moll, 2006; Peltzer, 2009).

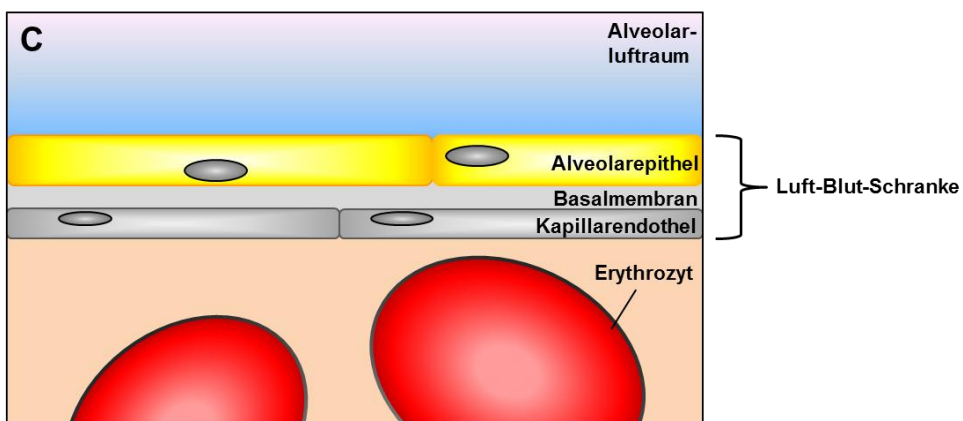
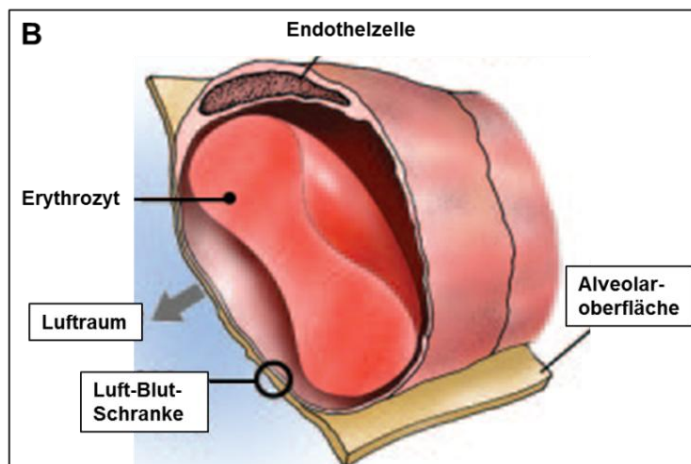
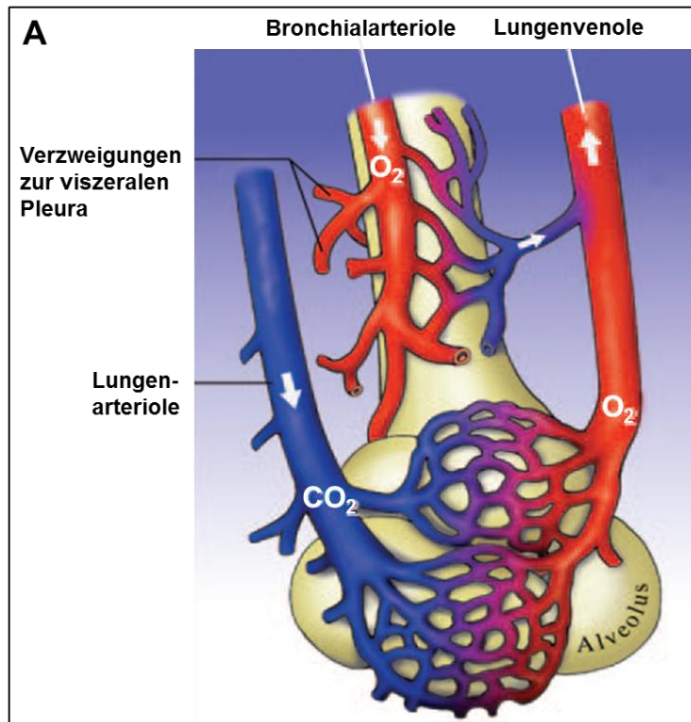


Abbildung 3: Blutgefäße der Lunge. **A)** Schematische Darstellung der Blutgefäße im Bronchial- und Lungensystem, **B)** Schematische Darstellung einer Lungenkapillare (modifiziert nach Aird, 2007), **C)** Schematische Darstellung der Luft-Blut-Schranke.

Bei einer akuten oder chronischen Entzündung des Endothels kommt es zu starken Permeabilitätsveränderungen (Hippenstiel and Suttorp, 2003). Bundgaard und Kollegen zeigten, dass die Gewebshormone Histamin und Serotonin bei initialen inflammatorischen Prozessen eine Permeabilitätssteigerung des Endothels bewirken und die transendotheliale Zellmigration erleichtern (Bundgaard, 1984). Leukozyten können durch das Endothel in das umgebende Gewebe einwandern (Sumpio *et al.*, 2002). Bei inflammatorischen Prozessen synthetisiert das Endothel Metalloproteasen, die die Zersetzung von Bindegewebsstrukturen bewirken (Donners *et al.*; Cines *et al.*, 1998). Darüber hinaus reguliert das Endothel durch Ausschüttung von Vasodilatoren und Vasokonstriktoren den Blutdruck (Majno and Palade, 1961; Baron *et al.*, 1989; Draijer *et al.*, 1995). Vasodilatoren führen zur Relaxation der Gefäßmuskulatur und Vasokonstriktoren bewirken die Kontraktion der glatten Muskelzellen in den Blutgefäßen (Sumpio *et al.*, 2002). Bei Entzündungsprozessen wird der Vasokonstriktor Endothelin-1 von Endothelzellen sekretiert. Endothelin-1 bewirkt eine Verringerung des Blutstroms (Miller *et al.*, 1993). Ein wesentlicher Mechanismus der physiologischen Endothelfunktion ist die ausreichende Synthese von Stickstoffmonoxid (NO^{\cdot}) (Stamler *et al.*, 1994). NO^{\cdot} ist ein reaktives Radikal und wirkt ubiquitär als sekundärer Botenstoff in Endothelzellen (Stamler *et al.*, 1994; Adnot *et al.*, 1995; Blitzer *et al.*, 1996). In niedrigen Konzentrationen ist es an physiologischen Prozessen wie der Regulation des Blutflusses, der Angiogenese und der Blutplättchen-Aggregation beteiligt (Stamler *et al.*, 1994; Adnot *et al.*, 1995). In erhöhten Konzentrationen ist NO^{\cdot} an entzündlichen Prozessen der Abwehr gegen Pathogene oder Tumore beteiligt (Moncada und Higgs, 1993). NO^{\cdot} wird daher als Schlüsselmolekül für die Aufrechterhaltung der Endothelfunktion angesehen (Stamler *et al.*, 1994; Adnot *et al.*, 1995; Blitzer *et al.*, 1996). Endothelzellen exprimieren verschiedene, spezifische Marker, die sie von anderen Zelltypen unterscheiden. Ein Beispiel ist der Rezeptor für Dil-acetyliertes Low Density Lipoprotein (Dil-Ac-LDL), das in Lysosomen aufgenommen und gespalten wird (Voyta *et al.*, 1984). Der Rezeptor für Dil-Ac-LDL wird nicht von glatten Muskelzellen und Fibroblasten exprimiert (Pelzer, 2009). Ein weiterer spezifischer Marker für Endothelzellen ist von Willebrand Faktor (VWF). VWF wird von Endothelzellen und Megakaryozyten, den Vorläufern der Blutplättchen exprimiert (Wagner, 1990).

2.6 Weibel-Palade-bodies (WPBs)

WPBs sind sekretorische Organellen von Endothelzellen (Valentijn *et al.*, 2008). Sie wurden erstmals 1964 von dem Schweizer Mediziner Prof. Ewald R. Weibel und dem rumänischen Physiologen Prof. George E. Palade beschrieben und im Folgenden nach ihren Entdeckern benannt (Weibel und Palade, 1964). Elektronenmikroskopische Aufnahmen visualisierten die Struktur und Form der WPBs (Abb. 4 A und B). Es sind zigarrenförmige, längliche Organellen von 1-5 μm Länge und 0,1-0,3 μm Breite mit charakteristischen länglichen Streifen (Valentijn *et al.*, 2011). Sie sind durch eine Membran vom Zytosol der Zelle abgegrenzt (Valentijn *et al.*, 2011). WPBs werden wie die sekretorischen Granula der endokrinen und neuroendokrinen Zellen am Transgolginetzwerk der Endothelzellen gebildet und reichern sich im Zytoplasma der Zellen an (Vischer *et al.*, 1997; Michaux und Cutler, 2004).

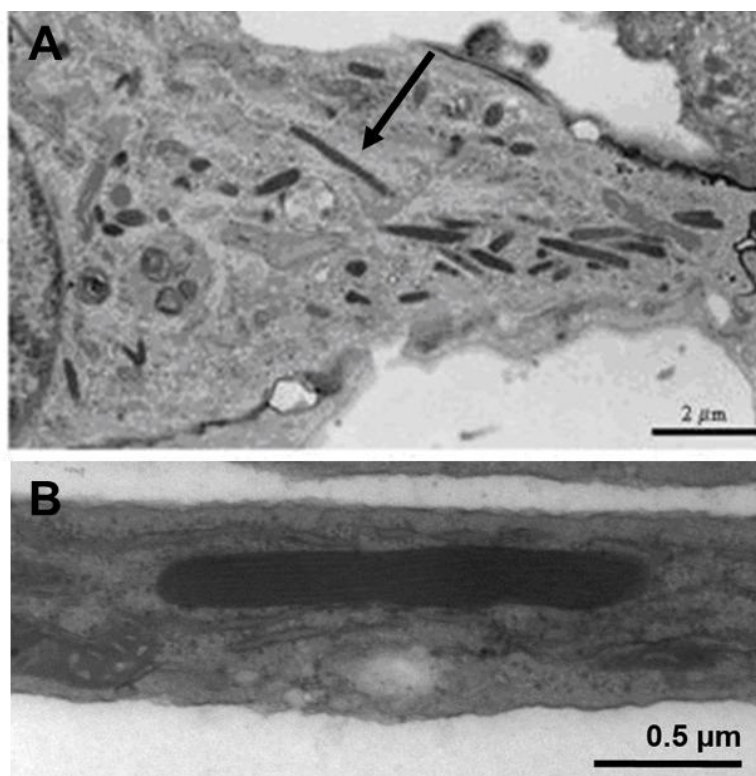


Abbildung 4: Transmissionselektronenmikroskopische Aufnahmen von WPBs in der Endothelzelle. A) WPBs (Pfeil) in einer Endothelzelle der humanen Nabelschnurvene (*Human umbilical vein endothelial cell, HUVEC*) (aus Valentijn *et al.*, 2008). **B)** WPB in einer humanen, mikrovaskulären Lungenendothelzelle (*Human pulmonary microvascular endothelial cell, HPMEC*) (Prof. Dr. M. Rohde, HZI, Braunschweig).

Zum Zeitpunkt ihrer Entdeckung waren der Inhalt und die biologische Funktion der WPBs noch unbekannt (Weibel und Palade, 1964). Ungefähr 20 Jahre später wurde erstmals gezeigt, dass WPBs VWF enthalten (Wagner *et al.*, 1982). VWF ist für die Bildung der WPBs essentiell (Valentijn *et al.*, 2011). Inzwischen wurden verschiedene andere Proteine in den WPBs identifiziert. Neben VWF sind die häufigsten Bestandteile der WPBs Interleukin-8, P-Selektin, Endothelin-1, *Endothelin-converting enzyme*, Gewebetyp-Plasminogenaktivator (t-PA), Eotaxin-3, Angiopoietin-2, Osteoprotegerin und Rab27A (Rondaij *et al.*, 2006; Metcalf *et al.*, 2008). Die Proteine werden in den Organellen gespeichert und durch externe Stimulation in den Blutstrom sekretiert (Michaux and Cutler, 2004; Metcalf *et al.*, 2008; Romani de Wit *et al.*, 2004; Goligorsky *et al.*, 2009). Im Folgenden werden die Funktionen einiger Bestandteile der WPBs näher beschrieben.

2.7 Die Hauptbestandteile der Weibel-Palade-bodies

Der Hauptbestandteil der WPBs ist VWF (Wagner *et al.*, 1990). Der VWF ist ein multi-Domänen Glykoprotein im Blutplasma von Säugetieren (Yamamoto *et al.*, 1998; Valentijn *et al.*, 2008). Die Konzentration von VWF im humanen Blutplasma betrug circa 50 nM (Borchiellini *et al.*, 1996). Die VWF-mRNA der Transkription wird in ein pre-pro-Polypeptid (Monomer mit 350 kDa) translatiert und besteht aus einem Signalpeptid von 22 Aminosäuren, einem langen Propeptid von 741 Aminosäuren und einem Peptid mit 2050 Aminosäuren (Michaux und Cutler, 2004). Im Endoplasmatischen Retikulum erfolgt die Dimerisierung des VWF-Proteins über die Ausbildung von Disulfidbrücken (Sadler, 1998). Die VWF-Dimere werden zum Golgi-Apparat transportiert, das Propeptid abgespalten und die VWF-Dimere bilden über weitere Disulfidbrücken bis zu 20 Millionen Da-große lineare Multimere mit 80 VWF-Untereinheiten (Sadler, 1998). Die VWF-Multimere und das Propeptid kondensieren zu Tubuli und werden am Trans-Golgi-Netzwerk (TGN) in Clathrin/AP-1-Vesikel eingelagert (Lui-Roberts *et al.*, 2005; Zenner *et al.*, 2007). Aus diesen Vesikeln entstehen die WPBs (Wagner *et al.*, 1991). Bei der Bildung der WPBs am TGN werden auch andere Proteine, wie P-Selektin oder Osteoprotegerin in die WPBs eingelagert (Harrison-Lavoie *et al.*, 2006; Zannettino *et al.*, 2005). Der Inhalt der WPBs wird zum Teil kontinuierlich und zum Teil nach Stimulierung der Endothelzellen in den Blutstrom sekretiert (Metcalf *et al.*, 2008; Wagner *et al.*, 1990;). Die Exozytose der WPBs führt zu einer Freisetzung von bis zu einigen Millimetern langen VWF-Fäden in den Blutfluss (Dong *et al.*, 2002). Die VWF-Moleküle werden durch die Plasma-Metalloprotease ADAMTS13 gespalten und das

Plasmaproteingewicht der VWF-Fragmente beträgt 176 kDa und 140 kDa (Dong *et al.*, 2002; Plaimauer *et al.*, 2002). Im Blutplasma ist VWF ein essentielles Schlüsselmolekül der Hämostase (Rondaij *et al.*, 2006). Die Hämostase beschreibt die Anheftung und Koagulation von Thrombozyten, der Aktivierung weiterer Thrombozyten und Bildung eines verschließenden, weißen Thrombozytenthrombus (Baklaja, 2008). Die Hämostase wird in die primäre und sekundäre Hämostase unterteilt, die miteinander in Wechselwirkung stehen (Baklaja, 2008). Bei der primären Hämostase sind Thrombozyten, Endothelzellen, glatte Muskelzellen und das Gewebe außerhalb des Gefäßes beteiligt. Sie dient zur schnellen Blutstillung durch Formation eines Thrombus (Baklaja, 2008). Bei diesem Prozess verbindet VWF die Thrombozyten mit den Kollagenfasern der subendothelialen Matrix (Wagner, 1990). Die sekundäre Hämostase beinhaltet eine enzymatische Kaskade, die zur Rekrutierung von Fibrinfäden führt (Baklaja, 2008). Der Thrombus wird durch die Fibrin-Fäden verstärkt (Baklaja, 2008). VWF wirkt in diesem Prozess als Kofaktor für den Blutgerinnungsfaktor VIII (FVIII) und schützt ihn vor Inhibierung durch Proteolyse (Wagner, 1990; Ruggeri, 1997; Ruggeri, 2007). Eine Störung der VWF-Synthese kann zum Krankheitsbild des „von Willebrand Syndrom“ führen (Nichols *et al.*, 2008). Hierbei handelt es sich um einen genetischen Defekt, der zu geringeren VWF-Konzentrationen im Blutplasma oder zu Mutationen innerhalb des *vwf*-Gens führt (Sadler und Rodeghiero, 2005). Die Symptome des „von Willebrand Syndroms“ reichen von einer verstärkten Blutungsneigung bis zu starken, schwer kontrollierbaren Blutungen, je nach Ausprägung des genetischen Defekts (Frederici *et al.*, 2000).

Ein weiterer Bestandteil der WPBs ist Interleukin-8 (IL-8) (Rondaij *et al.*, 2006; Metcalf *et al.*, 2008). Das Protein hat ein Molekulargewicht von 8 kDa und gehört zur Familie der Chemokine (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). Nach der Sekretion in den Blutstrom ist IL-8 hauptsächlich an der chemotaktischen Rekrutierung neutrophiler Granulozyten zum Infektionsherd beteiligt (Romani de Wit *et al.*, 2003; Oynebraten *et al.*, 2004). In seiner Funktion als chemotaktisches Zytokin fördert IL-8 auch die Migration von Endothelzellen in die Extrazelluläre Matrix (EZM) des infizierten Gewebes (Li *et al.*, 2003). Eine septische bakterielle Infektion führt zu einem signifikanten Anstieg der IL-8-Konzentration im Blutplasma (Franz *et al.*, 1999). Die Konzentration von IL-8 im Blutplasma wird daher in der Diagnose der bakteriellen Sepsis Erwachsener und Neugeborener eingesetzt (Franz *et al.*, 1999).

Das Transmembranprotein P-Selektin wird am TGN mit VWF in WPBs eingelagert (McEver *et al.*, 1989; Bonfanti *et al.*, 1989; Harrison-Lavoie *et al.*, 2006). Es besteht aus einer großen luminalen Domäne und einer kurzen cytoplasmatischen Domäne (Harrison-Lavoie *et al.*, 2006). Nach der Exozytose der WPBs bildet die luminal Domäne ein Zell-Adhäsionsmolekül

auf der Oberfläche von aktivierten Endothelzellen (Harrison-Lavoie *et al.*, 2006). Darüber hinaus ist P-Selektin an der Rekrutierung von Leukozyten zum infizierten Gewebe beteiligt und trägt daher entscheidend zur Immunantwort während einer Infektion bei (Mayadas *et al.*, 1993; Cambien and Wagner, 2004).

Weitere Komponenten der WPBs sind Endothelin-1 und das *endothelin-converting enzyme*. Diese Peptidhormone sind Vasokonstriktoren, die den Blutdruck regulieren und an der Kontrolle der vaskulären Tonizität beteiligt sind (Rondaij *et al.*, 2006). Angiopoietin-2 ist ein angiogenetisches Peptid, das nach Aktivierung des Endothels durch WPB-Exozytose in den Blutstrom sekretiert wird (Davis *et al.*, 2010). Es aktiviert Endothelzellen und erhöht die Entzündungsreaktion und die Permeabilität des Endothels (Davis *et al.*, 2010).

2.8 Ziele dieser Arbeit

Eine Infektion mit *Streptococcus pneumoniae* kann schwere invasive Erkrankungen, wie Lobärpneumonie, Sepsis oder Meningitis verursachen. Die Transmigration der Pneumokokken durch die Luft-Blut-Schranke in der Lunge führt zur Dissemination im vaskulären System. Die an den Transmigrationsprozessen beteiligten zellulären Faktoren sowie die zugrunde liegenden Pathogenitätsmechanismen der Pneumokokken, wurden bislang kaum untersucht. Die Aufklärung der Mechanismen, die zu einer invasiven Ausbreitung der Pneumokokken im Blutsystem führen, ermöglicht die Entwicklung neuer therapeutischer Strategien zur Bekämpfung von invasiven Pneumokokkeninfektionen.

Das mikrovaskuläre Lungenendothel stellt einen Hauptbestandteil der Luft-Blut-Schranke dar. Das vorrangige Ziel der vorliegenden Arbeit war daher die Charakterisierung der Interaktion von Pneumokokken mit humanen, mikrovaskulären Lungenendothelzellen (HPMEC). Zur Bearbeitung dieser wissenschaftlichen Fragestellung sollte zunächst eine nähere Charakterisierung der pulmonalen vaskulären Endothelzellen durchgeführt werden. Da Endothelzellen in Zellkultursystemen mit immortalisierten Zellen oft viele ihrer physiologischen Eigenschaften verlieren, sollten primäre Zellen verwendet werden. In Expressionstudien von speziellen Differenzierungsmarkern und Oberflächenproteinen sollte das Differenzierungsprofil von HPMEC mit dem von humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC), einem vielfach verwendetem Endothel-Modell, verglichen werden. Des Weiteren sollte unter Verwendung verschiedener *in-vitro*-Infektionsmethoden das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von Pneumokokken in die HPMEC aufgeklärt

werden. Das Zytotoxin Pneumolysin ist ein wichtiger Virulenzfaktor von Pneumokokken. Zur Untersuchung der Funktion des Pneumolysins in der Endothelinfektion sollte eine Pneumolysin-defiziente Mutante im Vergleich zu einem Pneumokokken-Wildtypstamm in verschiedenen *in-vitro*-Infektionsversuchen verwendet werden.

Die Aktivierung von Endothelzellen wird als ein wichtiger Bestandteil zur Stimulierung der wirtseigenen Immunabwehr diskutiert. Als ein weiteres Ziel dieser Arbeit sollte daher die Auswirkung untersucht werden, die eine Infektion von Endothelzellen durch Pneumokokken in Hinblick auf die Funktion der Endothelbarriere im vaskulären System hat. Neben der Analyse von Änderungen der Genexpression unter Verwendung eines humanen Genomchips im Microarray-Verfahren sollten durch Immunfluoreszenzanalysen morphologische Veränderungen und vesikuläre Exozytosevorgänge der Endothelzellen untersucht werden.

3. Material & Methoden

3.1 Materialien und Chemikalien

3.1.1. Verwendete Bakterienstämme

Tabelle 1: Verwendete *Streptococcus pneumoniae*-Stämme

Bakterienstamm	Serotyp	Charakteristika	Herkunft/Referenz
<i>S. p.</i> 35A	35A	NCTC10319, schwach bekapselter Laborstamm	Pracht <i>et al.</i> , 2005
<i>S. p.</i> 35A Δply	35A	Mutante von st35A, schwach bekapselt, Deletion des Pneumolysingens, Erythromycin ^R	Elm <i>et al.</i> , 2004
<i>S. p.</i> D39	2	bekapseltes Isolat	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005
<i>S. p.</i> D39 Δply	2	Mutante von D39, bekapselt, Deletion des Pneumolysingens, Erythromycin ^R	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005
<i>S.p.</i> D39 Δcps	2	Mutante von D39, Deletion des Kapselgenlocus, Kanamycin ^R	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005
<i>S. p.</i> D39 $\Delta ply, \Delta cps$	2	Doppelmutante von D39, Deletion des Pneumolysingens, Deletion des Kapselgenlocus, Erythromycin ^R , Kanamycin ^R	Hammerschmidt <i>et al.</i> , 2005

Tabelle 2: Weitere Bakterienstämme

Bakterienstamm	Herkunft
<i>Escherichia coli</i> DH5 α	Stammsammlung der Abt. Medizinische Mikrobiologie, HZI Braunschweig
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> PA1	Rolf Kramer, Abt. Vakzinologie, HZI Braunschweig

<i>Neisseria meningitidis</i> N4	Oliver Kurzai, Institut für Hygiene und Mikrobiologie, Universität Würzburg
<i>Staphylococcus aureus</i> st3	Stammsammlung der Abt. Infektionsimmunologie, HZI Braunschweig
<i>Streptococcus canis</i> G361	Stammsammlung der Abt. Medizinische Mikrobiologie, HZI Braunschweig
<i>Streptococcus pyogenes</i> S33	Stammsammlung der Abt. Medizinische Mikrobiologie, HZI Braunschweig

3.1.2 Kulturmedien für *Streptococcus pneumoniae*

Blutagarplatten (Becton Dickinson, USA)

THY-Medium (mit 1 % Hefe): 30,0 g/l Todd-Hewitt-Broth (Roth, Deutschland)
 1,0 % (w/v) Hefeextrakt (Becton Dickinson, USA)
 auf 1 l mit dH₂O auffüllen

Das THY-Medium wurde vor Gebrauch 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.1.3 Kulturmedien für *Escherichia coli*

LB-Medium: 10,0 g Trypton (Becton Dickinson, USA)
 5,0 g Hefeextrakt (Becton Dickinson, USA)
 10,0 g NaCl (Roth, Deutschland)
 auf 1 l mit dH₂O auffüllen

Zur Nutzung als Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 16,0 g/l Agar-Agar (Roth, Deutschland) zugefügt. Das LB-Medium wurde vor Gebrauch 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.1.4 Kulturmedien für weitere Bakterienstämme

Blutagarplatten (Becton Dickinson)

THY-Medium (mit 0,5 % Hefe): 30,0 g/l Todd-Hewitt-Broth (Roth, Deutschland)

0,5 % (w/v) Hefeextrakt (Becton Dickinson, USA)

auf 1 l mit dH₂O auffüllen

Zur Nutzung als Festmedium wurde vor dem Autoklavieren 16,0 g Agar-Agar (Roth, Deutschland)/1 l zugefügt. Das THY-Medium wurde vor Gebrauch 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.1.5 Eukaryotische Zellen und Zellkulturmedien

Tabelle 3: Verwendete Endothelzellen

Name der Zellen	Charakteristika	Herkunft
HPMEC (<i>Human pulmonary microvascular endothelial cells</i>)	Humane, mikrovaskuläre Lungenendothelzellen, vWF-positiv, CD31- positiv, Dil-Ac-LDL (Dil-markiertes, acetyliertes <i>Low-Density</i> -Lipoprotein)-Aufnahme positiv, smooth muscle alpha-actin negativ	C-12281, Passage 2, Promocell, Deutschland
HUVEC (<i>Human umbilical vein endothelial cells</i>)	Humane Endothelzellen der Nabelschnurvene (makrovaskulär), vWF- positiv, CD31-positiv, Dil-Ac-LDL (Dil-markiertes, acetyliertes <i>Low-Density</i> -Lipoprotein)-Aufnahme positiv, smooth muscle alpha-actin negativ	C-12200, Passage 1, Promocell, Deutschland

Tabelle 4: Zellkulturmedien für Endothelzellen

Endothelzellen/ Anwendung	Verwendetes Medium/Zusätze	Herkunft
HPMEC Kultivierung	Endothelial Cell Growth Medium MV (ECGM MV = Endothelial Cell Basal Medium MV + supplement mix) + 100 U/ml Penicillin + 0,1 mg / ml Streptomycin	Promocell, Deutschland
HPMEC Infektion	Endothelial Cell Basal Medium MV + 2,0 % fötales Kälberserum	Promocell, Deutschland
HUVEC Kultivierung	Endothelial Cell Growth Medium 2 (ECGM 2 = Endothelial Cell Basal Medium 2 + supplement mix) + 100 U/ml Penicillin + 0,1 mg/ml Streptomycin	Promocell, Deutschland
HUVEC Infektion	Endothelial Cell Basal Medium 2 + 2,0 % fötales Kälberserum	Promocell, Deutschland

3.1.6 Verwendete Antikörper und Antiseren

Tabelle 5: Zusammenstellung der ungekoppelten Antikörper und Antiseren

Antikörper/Serum	Herkunft
Kaninchen anti- <i>S. pneumoniae</i> Serum (generiert gegen hitze-inaktivierte Pneumokokken, Protein A aufgereinigt, siehe 3.4.7)	Pineda, Deutschland
Maus anti-Von Willebrand Faktor IgG	sc-73268, Santa Cruz, USA
Maus anti-Pecam-1 (CD 31) IgG	sc-13537, Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-PAF-R IgG	sc-20732, Santa Cruz, USA
Kaninchen anti-LYVE-1 IgG	sc-28190, Santa Cruz, USA
Maus anti-uPAR IgG	sc-13522, Santa Cruz, USA
Maus anti- β_1 -Integrin IgG	MAB2253, Millipore, USA
Maus anti- β_3 -Integrin IgG	MAB2023Z, Millipore, USA
Maus anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin IgG	MAB1976Z, Millipore, USA
Maus anti- α_2 -Integrin IgG	AB1936, Millipore, USA
Kaninchen anti-Fibrinogen IgG	Dr. S. R. Talay, HZI Braunschweig

Tabelle 6: Zusammenstellung der konjugierten Antikörper und Reagenzien

Antikörper/Serum	Herkunft
Ziege anti-vWF-IgG Peroxidase-konjugiert	GAVWF-HRP, Affinity Biologicals, USA (Vertrieb Hämochem Diagnostika, Deutschland)
Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 488-konjugiert	A11008, Invitrogen, USA
Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 568-konjugiert	A11011, Invitrogen, USA
Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor® 488-konjugiert	A11001, Invitrogen, USA
Phalloidin Alexa Fluor® 488-konjugiert	A12379, Invitrogen, USA
Phalloidin Alexa Fluor® 488-kongugiert	A12380, Invitrogen, USA

3.1.7 Verwendete Kits

Tabelle 7: Auflistung der Kits

Name des Kits	Herkunft
OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set	Becton Dickinson, USA
Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay	Promega, USA
RNeasy® Mini Kit	QIAGEN, Deutschland
TECHNOZYM® vWF:Ag Calibrator Set	Technoclone, Österreich (Vertrieb Hämochem Diagnostika, Deutschland)

3.1.8 Reagenzien und Puffer (sofern nicht in Methoden beschrieben)

Tabelle 8: Verwendete Reagenzien für Zellinkubationsversuche

Reagenz	Herkunft
Thrombin	Calbiochem, Deutschland
Histamin	Sigma-Aldrich, USA
Pneumolysin	Prof. T. J. Mitchell, Biomedical Research Centre, Glasgow, UK

Lipopolysaccharide (LPS) von <i>Salmonella typhimurium</i>	Sigma-Aldrich, USA
Lipoteichonsäuren (LTA) von <i>Staphylococcus aureus</i>	Sigma-Aldrich, USA

Tabelle 9: Verwendete Antibiotika

Antibiotikum	Verwendete Endkonzentration	Herkunft
Erythromycin	12,5 µg/ml (zur <i>S. pneumoniae</i> -Kultivierung)	Sigma-Aldrich, USA
Kanamycin	50,0 µg/ml (zur <i>S. pneumoniae</i> -Kultivierung)	Roth, Deutschland
Penicillin G	10 µg/ml (für Plattierungsversuche)	Sigma-Aldrich, USA
Gentamycin	100 µg/ml (für Plattierungsversuche)	Sigma-Aldrich, USA

Phosphatpuffer (PBS):

0,2 g KCl

8,0 g NaCl

0,2 g KH₂PO₄

1,43 g Na₂HPO₄

auf 1 l mit dH₂O auffüllen

pH 7,4

Das PBS wurde vor Gebrauch 20 min bei 121 °C autoklaviert.

3.2 Mikrobiologische Methoden

3.2.1 Kultivierung von *Streptococcus pneumoniae*

S. pneumoniae Stämme wurden ausgehend von Glycerolkonserven, unter Verwendung der entsprechenden Antibiotika, auf Blutagarplatten (Becton Dickinson) angeimpft und bei 37 °C

und 5 % CO₂ in einem Begasungsinubator (Thermo Scientific) für 6 Std. inkubiert. Nach der Kultivierung wurde mit einer Impföse etwas Bakterienmaterial abgenommen und damit eine weitere Blutagarplatte beimpft und diese bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsinubator (Thermo Scientific) über Nacht inkubiert. Die Anzucht der Pneumokokken in Flüssigkultur erfolgte in Todd-Hewitt Broth (Roth, Deutschland) mit 1 % Hefeextrakt (THY) und 10 % fötalem Kälberserum (FCS). Die Bestimmung der Bakteriendichte der Flüssigkulturen erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm. Die Flüssigkulturen wurden mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 angeimpft und im Wasserbad bei 37 °C, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,35 inkubiert.

3.2.2 Konservierung von *Streptococcus pneumoniae*

Zur längerfristigen Lagerung von *Streptococcus pneumoniae* wurden Kulturen in 25 % (v/v) Glycerin in THY resuspendiert. Hierfür wurden die Pneumokokkenstämme auf Blutagarplatten kultiviert, mit einem Wattestab abgenommen, in 1 ml 25 % Glycerin in THY in Einfrierröhrchen resuspendiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.3 Kultivierung von anderen Bakterienstämmen

Zur Untersuchung der VWF-Freisetzung aus HPMEC durch verschiedene Bakterienstämme, wurden *Escherichia coli* DH5α, *Pseudomonas aeruginosa* PA1, *Neisseria meningitidis* N4, *Staphylococcus aureus* st3, *Streptococcus canis* G361 und *Streptococcus pyogenes* S33 verwendet. *Escherichia coli* DH5α wurde aus einer Glycerolkonserve auf LB-Agar angeimpft und bei 37 °C in einem Inkubator (Thermo Scientific) über Nacht inkubiert. Die Kultivierung von *Escherichia coli* DH5α in Flüssigkultur erfolgte in LB-Medium. *Pseudomonas aeruginosa* PA1, *Streptococcus canis* G361 und *Streptococcus pyogenes* S33 wurden über Nacht auf THY (0,5 % Hefeextrakt)-Agar kultiviert, während *Neisseria meningitidis* N4 und *Staphylococcus aureus* st3 auf Blutagarplatten kultiviert wurden. Zur Erstellung von Flüssigkulturen wurden die Bakterien mit einem Wattestab von der Agarplatte abgenommen und in einer OD₆₀₀ von 0,35 in THY (0,5 % Hefeextrakt) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS)

resuspendiert. Die Bestimmung der Bakteriendichte in Flüssigkulturen erfolgte photometrisch durch Messung der optischen Dichte bei 600 nm.

3.2.4 Hitzeinaktivierung von Pneumokokken

Zur Hitzeinaktivierung von Pneumokokken wurden diese zunächst wie unter 3.2.1 Kultivierung von *Streptococcus pneumoniae* beschrieben, bis zum Erreichen einer OD₆₀₀ von 0,35 kultiviert. Die Kulturen wurden anschließend zentrifugiert (10 min, 3000 x g, Heraeus Biofuge 15R), die Sedimente mit 10 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 1 ml PBS resuspendiert. Ausgehend von dieser Suspension wurden die Pneumokokken photometrisch auf eine Konzentration von 1×10^9 Pneumokokken/ml in PBS eingestellt. Diese Bakterien wurden im Anschluss für 5 min bei 65 °C inkubiert. Diese kurze Hitzeinaktivierung tötete die Pneumokokken.

3.3 Zellkulturmethoden

3.3.1 Kultivierung von primären Endothelzellen

Die Kultivierung der primären Endothelzellen erfolgte in einem Begasungsinkubator (Thermo Scientific) bei 37 °C und 5 % CO₂. Die Zellkulturarbeiten wurden an einer sterilen Werkbank durchgeführt. Vor dem Gebrauch wurden die Materialien sterilisiert und die Medien auf RT vorgewärmt. Das Wachstum und die Morphologie der Zellen wurden am Mikroskop (Axiovert 25, Zeiss) kontrolliert.

3.3.2 Subkultivierung von primären Endothelzellen

HPMEC und HUVEC wurden von Promocell direkt nach der Isolation und Aufreinigung kryokonserviert (2. Passage) oder bereits proliferiert (3. Passage) geliefert. Die Zellen wurden in Zellkulturschalen (Durchmesser 10 cm, TPP) in zellspezifischem Medium (siehe 3.1.4) kultiviert. Das Medium wurde in Abständen von 2-3 Tagen gewechselt. Bei Erreichen einer subkonfluenten Zellschicht wurden die Zellen subkultiviert.

Zur Subkultivierung wurden HPMEC zunächst mit 5 ml HepesBSS (Promocell, Deutschland) gewaschen, um Medienreste und tote Zellen zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen für maximal 5 min mit 3 ml Trypsin/EDTA 2 (EDTA= Ethylendiamintetraacetat) (Promocell, Deutschland) inkubiert, bis sich die Mehrzahl der Zellen abgerundet hatte. Dann wurden 7 ml Medium zugegeben, um die Trypsinwirkung zu neutralisieren. Anschließend werden die Zellen mit einer Pipette von der Zellkulturschale gespült, bei 900 x g für 10 min zentrifugiert (Hereus Megafuge 1.0) und in 3 ml Medium resuspendiert. Zur weiteren Kultivierung wurden 4×10^5 Zellen in 10 cm- Zellkulturschalen in Zellkulturmedium ausgesät (Zellzahlbestimmung, siehe 3.3.5). Zur Kultivierung in 6 cm-Zellkulturschalen wurden 2×10^5 Zellen in Zellkulturmedium ausgesät. Die Subkultivierung der HPMEC erfolgte bis zum Erreichen der sechsten Passage.

HUVEC wurden zur Subkultivierung mit 5 ml Hepes BSS (Promocell) gewaschen und anschließend mit 3 ml Trypsin/EDTA (Promocell, Deutschland) für maximal 5 min inkubiert. Die Proteolyse des Trypsins wurde durch Zugabe von 7 ml Medium inhibiert und die Zellen von der Zellkulturschale gespült. Nach Zentrifugation der Zellsuspension bei 900 x g für 10 min (Hereus Megafuge 1.0) wurden die HUVEC in 4,0 ml Medium aufgenommen. Zur weiteren Kultivierung wurden 4×10^5 Zellen in 10 cm-Zellkulturschalen mit Medium ausgesät (Zellzahlbestimmung, siehe 3.3.5). Die Subkultivierung der HUVEC erfolgte bis zum Erreichen der achten Passage.

3.3.3 Kryokonservierung von primären Endothelzellen

Durch Lagerung in flüssigem Stickstoff werden eukaryotische Zellen langfristig konserviert. Zur Vorbereitung der Kryokonservierung wurde die nahezu konfluente Zellschicht der HPMEC mit Trypsin/EDTA 2 abgelöst (siehe 3.3.2.) und nach Zentrifugation in 900 µl

Medium mit 20 % FCS aufgenommen. Die Zellsuspension wurde in Konservierungsröhrchen mit Dimethylsulfoxid (DMSO, Endkonzentration 10 %) vereinigt und für 24 Std. bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefülltem Behälter eingefroren (Nalgene™ Cryo 1 °C Freezing Container). Der Behälter verhindert die Bildung von zellschädigenden Eiskristallen durch die kontrollierte Abkühlung von 1 °C/min. Die Menge einer konfluent bewachsenen Zellkulturschale mit HUVEC wurde auf zwei Einfrierröhrchen mit je 900 µl Zellkulturmedium mit 20 % FCS aufgeteilt, mit 10 % DMSO versetzt und ebenfalls bei -80 °C in einem mit Isopropanol gefülltem Behälter eingefroren. Nach 24 Std. wurden die Konservierungsröhrchen mit den Zellen in flüssigem Stickstoff eingelagert.

3.3.4 Auftauen von eukaryotischen Zellen

Zur Kultivierung wurden die im flüssigen Stickstoff gelagerten Zellen im Konservierungsröhrchen im Wasserbad bei 37 °C fast vollständig aufgetaut. Um die zellschädigende Wirkung des DMSO zu mindern, wurden die Zellen zügig mit 1 ml vorgewärmtem Zellkulturmedium versetzt und die Suspension vorsichtig in eine Zellkulturschale (TPP, Deutschland) mit vorgewärmtem Zellkulturmedium überführt und bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert. Nach Anheften der Zellen auf dem Boden der Zellkulturschale, wurde ein Medienwechsel durchgeführt.

3.3.5 Bestimmung der Zellzahl

Die Kultivierung von primären Endothelzellen erfordert die Aussaat von definierten Zellzahlen. Die Endothelzellen wurden wie in 3.3.2 beschrieben vom Boden der Zellkulturschale gelöst, die Zellsuspension zur Entfernung des Trypsins/EDTA 2 zentrifugiert und das Zellsediment mit Medium resuspendiert. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 20 µl der Zellsuspension in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Mit Hilfe eines Lichtmikroskops (ID03, Zeiss) wurden die Zellen von vier Großquadraten gezählt, der Mittelwert errechnet und unter Berücksichtigung des Volumens der Zellkammer wurde die Zellzahl/ml Suspension bestimmt.

3.4 Methoden zur Infektion von Endothelzellen mit Pneumokokken

3.4.1 Aussaat der Endothelzellen für Standardinfektionen

Für Infektions- oder Inkubationsversuche wurde die Zellzahl der abtrypsinisierten Zellen bestimmt (siehe 3.3.5) und die Zellen anschließend in 4-well oder 24-well-Platten (TPP, Deutschland) ausgesät. Für spätere Immunfluoreszenz-Färbungen oder elektronenmikroskopische Untersuchungen wurden die Endothelzellen auf Deckgläschen (Durchmesser 12 mm) ausgesät. HPMEC wurden in einer Konzentration von 3×10^4 Zellen in 500 µl Zellkulturmedium pro well ausgesät und für 72 Std. bis zum Erreichen der Konfluenz kultiviert. HUVEC wurden mit einer Konzentration von 2×10^4 Zellen in 500 µl Zellkulturmedium pro well ausgesät und für 48 Std. bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht kultiviert. Die Konfluenz der Zellschicht wurde durch Messung des elektrischen Widerstandes und der Kapazität mit dem cellZscope® (Nanoanalytics) bestimmt.

3.4.2 Durchführung der Zellkulturinfektion

Zur Vorbereitung von Infektionsversuchen wurden die Pneumokokkenstämme der Blutagarplatte in Flüssigkulturen angeimpft. Die Anzucht erfolgte mit einer Start-OD₆₀₀ von 0,1 in Todd-Hewitt Broth (Roth) mit 1 % Hefeextrakt (THY) und 10 % fötalem Kälberserum. Die Flüssigkulturen wurden im Wasserbad bei 37 °C bis zu einer OD₆₀₀ von 0,3-0,4 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen zentrifugiert (10 min, 3000 x g, Heraeus Biofuge 15R), die Sedimente mit 10,0 ml PBS gewaschen und nach erneuter Zentrifugation in 1 ml PBS resuspendiert. Ausgehend von dieser Suspension wurden die Pneumokokken photometrisch auf 1×10^8 Pneumokokken/ml in antibiotikafreiem Endothelial Cell Basal Medium MV (Promocell, Deutschland) mit 2 % fötalem Kälberserum, eingestellt. Zur Kontrolle der eingestellten Bakterienmenge wurde das Inokulum in einer Verdünnungsreihe bis 100 Bakterien/ml auf Blutagar ausplattiert und bei 37 °C im Begasungsininkubator (Thermo Scientific) kultiviert.

Vor der Infektion wurden die Endothelzellen dreimal mit 37 °C-warmen, antibiotikafreiem Infektionsmedium (siehe 3.1.5) gewaschen und mit den vorbereiteten Pneumokokken in der entsprechenden MOI (*multiplicity of infection*) infiziert. Die Inkubation der infizierten

Endothelzellen erfolgte bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsininkubator (Thermo Scientific).

3.4.3 Durchführung der Plattierungsanalysen

Nach 3,0 Std. Inkubationszeit der Zellen mit Pneumokokken wurden nicht adhärenente Pneumokokken durch dreimaliges Waschen der Zellen mit Infektionsmedium entfernt und die Infektion weitere 1,5 Std. inkubiert, um eine weitere Internalisierung der adhärenenten Pneumokokken in die Zellen zu ermöglichen. Nach Ablauf der Infektionszeit wurden die infizierten Zellen erneut dreimal mit Infektionsmedium gewaschen. Zur Plattierung wurden die infizierten Zellen für 10 min bei 37 °C mit 300 µl Saponin-Lösung inkubiert und anschließend in einer Verdünnungsreihe von 10⁰ bis 10⁻⁵ auf Blutagar plattiert. Saponin ist ein mildes Detergenz, das Cholesterol aus Plasmamembranen verdrängt. Bei Verwendung von geringen Saponin-Konzentrationen wird die Zelle permeabilisiert, aber die zell-assoziierten Bakterien bleiben intakt.

Zur Quantifizierung der internalisierten Pneumokokken wurden die infizierten Zellen mit 1 ml Infektionsmedium mit 10 µg/ml Penicillin G und 100 µg/ml Gentamycinlösung/well inkubiert. Die Antibiotika lysieren die adhärenenten Pneumokokken, während die internalisierten Pneumokokken in den Zellen vital bleiben. Nach 1,0 Std. Inkubationszeit mit Antibiotika-haltigem Medium wurden die Zellen 10 min bei 37 °C mit 300 µl Saponin-Lösung inkubiert und anschließend in einer Verdünnung von 10⁰ bis 10⁻² auf Blutagar plattiert. Die Blutagarplatten wurden über Nacht bei 37 °C und 5 % CO₂ inkubiert und die gewachsenen Kolonien wurden am nächsten Tag ausgezählt.

Saponin-Lösung:

1 % Saponin in Infektionsmedium

sterilfiltriert

3.4.4 Weiterführende Analysen nach Zellkulturinfektion

Im Anschluss an die Zellkulturinfektion erfolgte die Vorbereitung der Zellen für die Immunfluoreszenzmikroskopie. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die Deckgläschen in den Wells mit 1 ml Fixierungspuffer fixiert. Zur Immunfluoreszenzfärbung von VWF wurden die Zellen für 20 min bei 4 °C fixiert. Bei anderen Färbungen erfolgte die Fixierung bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung.

Fixierungspuffer IF: 1 % Paraformaldehyd in PBS

 Sterilfiltriert

Zur Vorbereitung weiterführender Proteindetektion wurden die Zellkulturüberstände der infizierten Zellen direkt zur Detektion in ELISA-Analysen verwendet oder in sterilen Eppendorf-Reaktionsgefäßen bei -80 °C eingefroren.

3.5 Immunfluoreszenzfärbung (IF) und Mikroskopie

3.5.1 Differentielle, indirekte Immunfluoreszenzfärbung von Pneumokokken

Zur mikroskopischen Visualisierung wurden die adhärenenten und internalisierten Pneumokokken mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Die differentielle Immunfluoreszenzfärbung ermöglicht eine Unterscheidung von extrazellulären und intrazellulären Pneumokokken. Für die Immunfluoreszenzfärbung wurden die Deckgläschen mit den infizierten und fixierten HPMEC aus den wells der Zellkulturplatte entnommen, dreimal in PBS gewaschen und in einer feuchten Kammer mit den jeweiligen Antikörpern für jeweils 20 min unter Lichtausschluss inkubiert. Um eine unspezifische Bindung der Antikörper zu vermeiden wurden die fixierten Zellen zunächst für 15 min mit 50 µl Absättigungspuffer inkubiert. Extrazelluläre Pneumokokken wurden durch Inkubation mit 50 µg/ml Kaninchen anti-Pneumokokken IgG für 20 min bei RT markiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit 10 µg/ml Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 488-konjugiert (siehe Abb. 5 B). Nach weiterem dreimaligem Waschen wurden die Zellen durch 5-minütige Inkubation mit 0,1 % Triton-X-100 permeabilisiert. Die Markierung der intrazellulären

Pneumokokken, die durch die Permeabilisierung für Antikörper zugänglich waren, erfolgte durch Inkubation der Zellen mit 50 µg/ml Kaninchen anti-Pneumokokken IgG für 20 min bei RT, gefolgt von der Inkubation mit 6,7 µg/ml Ziege anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 568-konjugiert für 20 min bei RT (siehe Abb. 5 C).

Absättigungspuffer: 10 % fötales Kälberserum in PBS

3.5.2 Direkte Fluoreszenzfärbung von F-Aktin

Zur Fluoreszenzmarkierung der Aktin-Fasern der HPMEC-Zellen wurden die Deckgläschen mit 4 U/ml Alexa Fluor® 488-Phalloidin oder 4 U/ml Alexa Fluor® 568-Phalloidin für 20 min bei RT inkubiert (siehe Abb. 5 D). Das Toxin Phalloidin des Knollenblätterpilzes lagert sich an F-Aktin und verhindert dadurch eine Depolymerisation der Aktin-Faser.

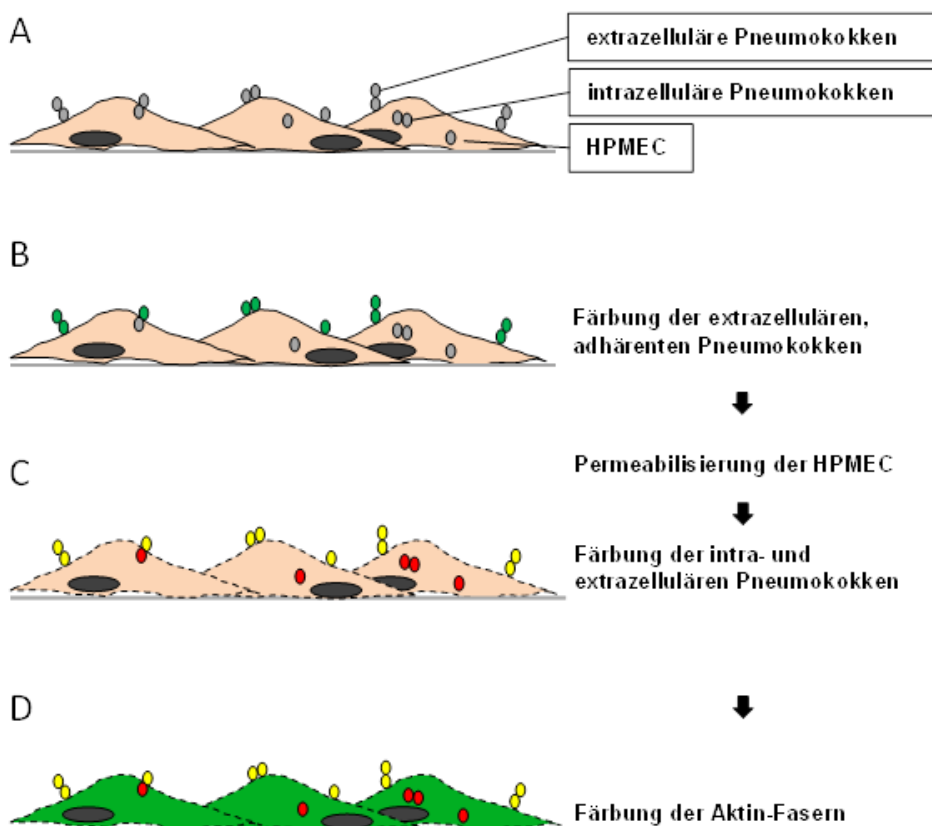


Abbildung 5: Modell der Immunfluoreszenzfärbung von Pneumokokken und Aktin. A) HPMEC mit extrazellulären und intrazellulären Pneumokokken **B)** Färbung der

extrazellulären, adhärenenten Pneumokokken mit Kaninchen anti-Pneumokokken IgG und Ziege Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 488-konjugiert (grün) **C)** Permeabilisierung der HPMEC mit Triton-X 100 und Färbung der intrazellulären und extrazellulären Pneumokokken mit Kaninchen anti-Pneumokokken IgG und Ziege Anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 568-konjugiert (rot) **D)** Färbung der Aktin-Fasern mit Phalloidin Alexa Fluor® 488-konjugiert (grün).

3.5.3 Indirekte Fluoreszenzfärbung von Weibel-Palade bodies

Die Visualisierung der WPBs erfolgte durch Detektion von VWF, dem Speicherprotein von WPBs. Zur Färbung des VWF wurden die Endothelzellen auf den Deckgläschen für 1 min 45 sec in eiskaltem Methanol-Aceton inkubiert, gewaschen und anschließend mit 3,3 µg/ml Maus anti-Von Willebrand Faktor IgG für 20 min bei RT inkubiert. Organische Substanzen, wie Alkohole oder Aceton, entfernen Lipide und präzipitieren die Proteine der Zelle durch Dehydration. Die Fluoreszenzmarkierung des VWF erfolgte durch 20-minütige Inkubation mit Ziege anti-Maus IgG Alexa Fluor® 488-konjugiert.

Nach den Inkubationen zur Färbung der verschiedenen Zellkomponenten wurden die Deckgläschen mit den infizierten Zellen zur Langzeitaufbewahrung und mikroskopischen Analyse dreimal gewaschen und in 3 µl ProLong® Gold antifade reagent eingebettet, mit Nagellack versiegelt und bei 4 °C dunkel gelagert.

3.5.4 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung

Zur Visualisierung von adhärenenten und internalisierten Pneumokokken wurde eine differentielle Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt (siehe 3.5.1) und die Infektionsexperimente am Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Fluoreszenzmikroskopie basiert auf der Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen (Fluorochrome), die an Antikörper oder andere Proteine gekoppelt sind, mit Licht einer bestimmten Wellenlänge. Dadurch fluoreszieren die Fluorochrome, d. h. sie emittieren Licht einer größeren Wellenlänge als der Anregungswellenlänge (Madigan, 2003). Die Anregung der Fluorochrome erfolgt mit einer

Quecksilber-Dampflampe. Im Mikroskop lenken mehrere Filter und Spiegel das Fluoreszenzlicht zum Objektiv oder einer Kamera. Durch die Überlagerung der Sekundärantikörper erscheinen adhärente Pneumokokken (Alexa Fluor 488/568-markiert) gelb und internalisierte Pneumokokken (Alexa Fluor 568-markiert) rot. Das VWF-Protein wurde mit Alexa Fluor-488-konjugierten Antikörpern markiert und erscheint grün, während F-Aktin entweder mit Alexa Fluor-488 oder Alexa Fluor-568 markiert wurde und grün oder rot erscheint. Die Auszählung der Pneumokokkenadhärenz und -internalisierung erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiophot HBO 50, Zeiss). Zur optischen Visualisierung wurden die Objektive Plan-Neofluar 40 x 1,3 oil, Plan-Neofluar 63 x 1,25 oil und Plan-Neofluar 100 x 1,3 oil von Zeiss eingesetzt. Zur Bestimmung der Adhärenz und Internalisierung der Pneumokokken wurden mindestens 30 Zellen pro Deckgläschen aus mindestens drei unabhängigen Experimenten ausgezählt. Bei der Unterscheidung von WPB-positiven und WPB-negativen HPMEC wurden mindestens 200 Zellen ausgezählt. Zur Aufnahme der fluoreszenzmikroskopischen Abbildungen wurde das Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 (Zeiss), die Kamera AxioCamHRm (Zeiss) und die Software Axio Vision 4.7 (Zeiss) verwendet. Die Abbildungen repräsentieren Z-Projektionen von mindestens 8 Einzelbildern mit einer jeweiligen Distanz von 300 nm. Hierzu wurden das Ölobjektiv mit der Bezeichnung EC Plan Neofluar 40 x 1,3 Öl und das Wasserobjektiv mit der Bezeichnung LCI Plan Neofluar 63 x 1,3 Wasser verwendet. Die Z-Projektionen der Kanäle wurden mit Huygens®Essential 3.7 (Hilversum, Niederlande) von Dr. Andreas Nerlich (Zentrum für Infektionsmedizin, Institut für Mikrobiologie, Stiftung Tierärztliche Hochschule Hannover) dekonvolutiert. Diese Prozessierung ermöglicht einen mathematischen Ausschluss von Streusignalen, die außerhalb des Schärfebereichs liegen. Dazu wurden *theoretical point spread functions* und ein *maximum likelihood-estimation* Algorithmus angewendet. Die dekonvolutierten Z-Projektionen wurden mit Fiji/ImageJ (<http://pacific.mpi-cpi.de/wiki/index.php/Fiji>) weiterbearbeitet, in Maximumintensitätsprojektionen umgewandelt und lineare Kontrast- und Helligkeitsanpassungen in den einzelnen Kanälen vorgenommen. Anschließend wurden die Bilder der einzelnen Kanäle übereinandergelegt, skaliert und Maßstabsbalken eingefügt.

3.5.5 Transmissionselektronenmikroskopie (TEM)

Für die Visualisierung von WPBs in HPMEC wurde ein Transmissionselektronenmikroskop benutzt. HPMEC in Passage 3 wurden wie in 3.3.2 beschrieben in 6 cm-Zellkulturschalen

ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur Konfluenz kultiviert. Für die Untersuchungen am Transmissionselektronenmikroskop wurden die HPMEC in 5 ml TEM-Fixierungspuffer für 1,0 Std. bei 4 °C fixiert. Die weitere Aufbereitung der Proben wurde von Ina Schleicher (Abt. Medizinische Mikrobiologie, HZI Braunschweig) durchgeführt. Es erfolgte eine Ferrocyamid-Osmium-Fixierung mit TCH, die Entwässerung der Proben in einem aufsteigenden Aceton-Gradienten (10 %, 30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %), eine kritische Punkttrocknung in flüssigem CO₂ und anschließend die Einbettung der Proben in Spurr-Harz (Spurr *et al.*, 1969). Nach Polymerisierung des Harzes wurden Dünnschnitte der Probe angefertigt und nach Nachkontrastierung am TEM untersucht. Die Untersuchungen und Aufnahmen am Transmissionselektronenmikroskop erfolgten durch Prof. Dr. Manfred Rohde (Abt. medizinische Mikrobiologie, HZI Braunschweig).

<u>Cacodylatpuffer:</u>	100 mM Cacodylat
	90 mM Saccharose
	10 mM MgCl ₂
	10 mM CaCl
	in dH ₂ O
	pH 6,9

<u>Fixierungspuffer TEM:</u>	100 mM Cacodylatpuffer
	2 % Glutaraldehyd
	5 % Paraformaldehyd

3.6 Infektionsanalysen im Zweikammer-Transwell-System

Das Zweikammer-Transwell-System von Becton Dickinson Bioscience (USA) unterteilt das *well* einer 24-well-Zellkulturplatte in zwei Kammern, die durch eine semipermeable Membran (0,4 µm Porendurchmesser) getrennt sind. Ein Porendurchmesser von 0,4 µm verhindert die

Transmigration von Pneumokokken. Die Trennung von Zellen und Bakterien durch eine semipermeable Membran ermöglicht die Inkubation der Zellen mit sekretierten Pneumokokkenfaktoren. Die HPMEC wurden wie in 3.4.1 beschrieben auf dem Boden des Transwell-Systems ausgesät und bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht kultiviert. Die Kultivierung und Vorbereitung der Pneumokokken erfolgte wie in 3.4.2 beschrieben. In die obere Kammer wurden 5×10^6 Pneumokokken gegeben und für 2,5 Std. inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde der Zellkulturüberstand der unteren Kammer abgenommen und für ELISA-Analysen (siehe 3.4.7) verwendet. Zur Kontrolle der Undurchlässigkeit der semipermeablen Membran wurden Teilmengen der unteren Kammer auf Blutagarplatten plattiert, diese bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsinubator (Thermo Scientific) kultiviert und die Blutagarplatten am nächsten Tag auf Bakterienwachstum untersucht.

Das Zweikammer-Transwell-System mit einer semipermeablen Membran der Porengröße von 3,0 µm (Becton Dickinson Bioscience, USA) ermöglicht die Kultivierung einer polarisierten Endothelbarriere und erlaubt die endotheliale Transmigration von Pneumokokken. Um das Anheften der Zellen auf der semipermeablen Membran zu fördern wurde die Membran vor der Aussaat der Zellen mit 0,1 % Gelatine-Lösung bei 37 °C für 1,0 Std. inkubiert und die Gelatine anschließend durch Inkubation mit 0,5 % Glutaraldehyd-Lösung für 25 min bei RT quervernetzt. Für Infektionen der HPMEC von der apikalen Seite der polarisierten Zellschicht wurden 3×10^4 HPMEC je Transwell-Einsatz in die obere Kammer auf der Gelatine-Membran ausgesät und bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsinubator (Thermo Scientific) kultiviert. Für Infektionen der HPMEC von der basalen Seite der polarisierten Zellschicht wurden die HPMEC mit einer Konzentration von 3×10^4 Zellen/Transwell-Einsatz auf der Membranunterseite des Transwell-Einsatzes ausgesät und bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsinubator (Thermo Scientific) invers kultiviert. Nach Erreichen einer konfluenten HPMEC-Zellschicht wurden die Zellen wie in 3.4.3 beschrieben mit 5×10^6 Pneumokokken für 4,5 Std. infiziert. Nach der Inkubationszeit wurde der zelluläre Überstand der oberen bzw. unteren Kammer abgenommen und für ELISA-Analysen (siehe 3.4.7) verwendet.

3.7 Messung der Konfluenz von Endothelschichten

Die Morphologie und Konfluenz der HPMECs wurde in jedem Versuch mikroskopisch kontrolliert. Eine genauere Bestimmung der Zellkonfluenz erfolgte durch Messung des

elektrischen Widerstandes (TER) und der Kapazität (C_{cl}) mit dem cellZscope® (NanoAnalytics, Deutschland).



Abbildung 6: Das cellZscope®. Das Foto des cellZscope® zeigt das Zell-Modul, den externen Controller und einen Computer mit der cellZscope®-Software.

Das cellZscope® ist ein Gerät zur Messung von transepithelialen und transendothelialen Widerständen von Zellschichten unter physiologischen Bedingungen. Konfluente Zellschichten haben einen hohen elektrischen Widerstand und Zellschichten mit hoher Permeabilität weisen einen niedrigen elektrischen Widerstand auf (Anleitung des cellZscope®, NanoAnalytics, Deutschland). Auf Grund dessen ist der elektrische Widerstand ein geeigneter Parameter um die Permeabilität von barriereformenden Zellschichten zu messen. Der elektrische Widerstand spiegelt außerdem die Ausbildung von Zell-Zell-Kontakten wieder, die für die Ausbildung der Barrierefunktion einer Zellschicht verantwortlich sind (Anleitung des cellZscope®, NanoAnalytics, Deutschland). Die Expression von Mikrovilli und anderen Membrankomponenten wird durch die elektrische Kapazität einer Zellschicht verdeutlicht (Anleitung des cellZscope®, NanoAnalytics, Deutschland). Die Analyse der Barrierefunktion von Zellschichten erfolgt durch die Messung des elektrischen Widerstandes und wird durch die Messung der elektrischen Kapazität ergänzt. Die Messung erfolgt transendothelial über zwei Elektroden, über und unter der Zellschicht. Die erhaltenden Daten

der Messung werden basierend auf einem Algorithmus des Systems evaluiert (Anleitung des cellZscope®, NanoAnalytics, Deutschland).

Das cellZscope® besteht aus zwei Einheiten: dem Zell-Modul und dem externen Controller. Darüber hinaus ist zur Datenevaluierung ein Computer mit der cellZscope®-Software notwendig. Zur Messung des elektrischen Widerstandes und der elektrischen Kapazität wurden Transwell-Einsätze des Zweikammer-Transwell-Systems (Porengröße von 3,0 µm, Becton Dickinson, USA) in die Vertiefungen des Zell-Moduls eingesetzt und die Endothelzellen wie in 3.4.6 beschrieben ausgesät. Das Zell-Modul wurde bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsininkubator (Thermo Scientific) inkubiert und jede Stunde erfolgte eine Messung des elektrischen Widerstandes (TER) und der Kapazität (C_{cl}). Der Verlauf der Messung des elektrischen Widerstands und der Kapazität wurden als Kurvendiagramme dargestellt. Um die Zellschicht mit Nährstoffen zu versorgen wurde jeden 3. Tag ein Mediumwechsel durchgeführt. Bei Erreichen des höchsten Widerstandes in Verbindung mit niedrigster Kapazität wurde die absolute Konfluenz der Zellschicht erreicht (Anleitung des cellZscope®, NanoAnalytics, Deutschland). Als Kontrolle wurden Transwell-Einsätze mit quervernetzter Gelatine ohne Zellen verwendet. Die erhaltenen Messdaten wurden mit der cellZscope®-Software evaluiert und der elektrische Widerstand und die elektrische Kapazität als Kurvendiagramm dargestellt.

3.8 Präparation von Pneumokokkenmembranproteinen

Die Präparation von Pneumokokkenmembranproteinen wurde von Astrid Dröge (Abt. Medizinische Mikrobiologie, HZI Braunschweig) durchgeführt.

Zur Isolierung der Membranproteine von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35AΔply wurden beide Stämme in jeweils 400 ml THY mit 10 % fötalem Kälberserum bis zu einer OD₆₀₀ von 0,6 kultiviert (siehe 3.2.1). Die Flüssigkulturen wurden zentrifugiert (4000 x g, 15 min, 4 °C, Thermo Scientific), mit 10 mM Tris-Puffer (pH 7,2) gewaschen und das Sediment in 10 mM Tris-Puffer (pH 8,0) mit 1 mM Proteaseinhibitor Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) und 5000 U/ml Mutanolysin resuspendiert. Die Suspension wurde dreimal in einer FrenchPress-Zelle (Amicon) mechanisch lysiert und noch intakte Bakterien wurden durch zentrifugieren (10000 x g, 50 min, 4 °C, Thermo Scientific) entfernt. Die Überstände dieser Zentrifugation wurden bei 10000 x g für 60 min zentrifugiert. Das Sediment enthielt Pneumokokkenmembran- und Zellwandproteine. Die Proteine wurden

in 500 µl CHAPS ({3-[(3-cholamidopropyl)-dimethylammonio]-1-propansulfo-nat})-Puffer mit 1 mM PMSF resuspendiert und zum Lösen der Membranproteine für 30 min mit dem zwitterionischen Detergenz schrittweise inkubiert (5 mM, 10 mM, 20 mM und 50 mM CHAPS). Die Suspensionen wurden zentrifugiert, die Überstände vereinigt und die erhaltenen Proteine bei 4 °C in PBS dialysiert. Zur Bestimmung der Proteinmenge wurde eine Bradford-Proteinbestimmung mit Bradford-Reagenz (Bio Rad) nach Protokoll des Herstellers durchgeführt.

0,01 M Tris-Puffer:

0,01 M Tris in dH₂O

pH 8,0

CHAPS-Puffer:

150 mM KCl

10 mM EDTA

0,1 M Kaliumphosphatpuffer

pH 7,2

3.9 Inkubation von HPMEC mit physiologischen Substanzen

Verschiedene biologische Substanzen induzieren eine Freisetzung von WPB-Komponenten aus Endothelzellen (Vischer *et al.*, 1997). Zur Untersuchung der WPB-Exozytose aus humanen Lungenendothelzellen nach Inkubation mit verschiedene biologischen Substanzen wurden HPMEC wie in 3.4.1 beschrieben kultiviert und mit 1 U/ml Thrombin, 1 mM Histamin, 1 ng/ml und 3 ng/ml Pneumolysin, sowie 4 µg/ml Lipopolysaccharide (LPS) von *Salmonella typhimurium* und 4 µg/ml Lipoteichonsäuren von *Staphylococcus aureus* für 2,5 Std. inkubiert. Darüber hinaus wurde die induzierende Wirkung von 1 U/ml Thrombin, 1 mM Histamin und 3 ng/ml Pneumolysin im Zeitverlauf von 0,5 Std. bis 4,5 Std. untersucht. Zur Eingrenzung des bakteriellen Auslösers der WPB-Exozytose wurden Pneumokokkenmembranproteine von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35AΔply präpariert (siehe 3.4.5) und jeweils 4 µg/ml für 2,5 Std. mit HPMEC inkubiert. Nach der Inkubation der Zellen mit den biologischen Substanzen und den

Pneumokokkenmembranproteinen wurden die Zellkulturüberstände abgenommen und zur Detektion von IL-8 und VWF in ELISA-Analysen verwendet.

3.10 Infektion von HPMEC mit verschiedenen Bakterienstämmen

Zur Untersuchung der VWF-Sekretion von HPMEC durch verschiedene Bakterien wurden HPMEC mit *Echerischia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* PA1, *Neisseria meningitidis* N4 und *Staphylococcus aureus* st3, *Streptococcus canis* G361 und *Streptococcus pyogenes* S33 infiziert und VWF im Zellkulturüberstand bestimmt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte wie in 3.2.3 beschrieben. Die Bakterien wurden mit einem Wattestab von der Agarplatte abgenommen und in einer OD₆₀₀ von 0,35 in THY (0,5 % Hefeextrakt) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS) resuspendiert. Die Kulturen wurden zentrifugiert, mit PBS gewaschen und in 1 ml PBS resuspendiert. Im Anschluss wurde jede Bakteriensuspension photometrisch auf 1×10^8 Bakterien/ml in antibiotikafreiem Endothelial Cell Basal Medium MV (Promocell, Deutschland) mit 2 % fötalem Kälberserum, eingestellt. Zur Kontrolle der eingestellten Bakterienmenge wurde das Inokulum jedes Bakterienstammes in einer Verdünnungsreihe auf 100 Bakterien verdünnt und auf Agarplatten ausplattiert. Die HPMEC wurden 1 Std. vor der Infektion mit 37 °C-warmen Endothelial Cell Basal Medium MV (Promocell, Deutschland) mit 2 % fötalem Kälberserum gewaschen. Anschließend wurden die HPMEC mit jeweils 1×10^7 Bakterien des Stammes *Echerischia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* PA1, *Neisseria meningitidis* N4 und *Staphylococcus aureus* st3 pro well infiziert. Die Infektion mit *Streptococcus canis* G361 und *Streptococcus pyogenes* S33 erfolgte mit 1×10^6 Bakterien pro well. Die infizierten HPMEC wurden bei 37 °C und 5 % CO₂ in einem Begasungsinubator (Thermo Scientific) für 2,5 Std. inkubiert. Zur Untersuchung der VWF-Freisetzung aus HPMEC wurde die VWF-Menge in den Zellkulturüberständen durch ELISA-Analysen bestimmt.

3.11 Aufreinigung polyklonaler Antikörper

Die Protein-A-Affinitätschromatographie zur Aufreinigung polyklonaler IgG aus dem Serum von Pneumokokken-infizierten Kaninchen wurde von Ina Schleicher (Abt. Medizinische Mikrobiologie, HZI Braunschweig) durchgeführt.

Das Serum von Pneumokokken-infizierten Kaninchen (generiert von Fa. Pineda, Deutschland) enthielt polyklonale Antikörper gegen *S. pneumoniae* und wurde über eine mit Protein-A-gekoppelte Säule (Pharmacia) aufgereinigt. Protein A aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* bindet reversibel an die Fc-Domäne von IgG. Diese Bindungseigenschaft ermöglicht die Filterung polyklonaler IgG aus dem Serum. Der Verlauf der Beladung, Waschung und Elution der Säule wurden bei OD₂₈₀ mit einem Durchflussphotometer (Pharmacia) kontrolliert. Die Antikörper wurden mit Elutionspuffer eluiert und in Fraktionen gesammelt, in denen Neutralisierungspuffer vorgelegt war. Fraktionen mit hoher Proteinmenge wurden vereinigt und bei -20 °C bis zur Verwendung gelagert.

<u>Elutionspuffer:</u>	0,1 M Glycin in dH ₂ O
	pH 3,0
<u>Neutralisierungspuffer:</u>	1,5 M Tris-HCl in dH ₂ O
	pH 8,8

3.12 Biochemische Methoden

3.12.1 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Quantifizierung von VWF in Zellkulturüberständen

Zur Bestimmung der VWF-Menge im Zellkulturüberstand von infizierten HPMEC wurde ein Enzym-gekoppelter Nachweistest (ELISA) durchgeführt. Zur Detektion von VWF wurden Maus anti-von Willebrand Faktor IgG und Peroxidase-konjugierte anti-VWF-IgG aus der

Ziege verwendet. Als Proteinstandard wurde das TECHNOZYM® vWF:Ag Calibrator Set (Technoclone, Österreich) verwendet. Zunächst wurden 5 µg/ml Maus anti-von Willebrand Faktor IgG in 0,05 M NaHCO₃-Puffer über Nacht in 96-well-Patten (ELISA-Platte Microlon 96w, Greiner Bio-one) immobilisiert. Nach der Immobilisierung wurden die wells dreimal mit PBS-T gewaschen. Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die wells für eine Stunde bei RT mit 200 µl Absättigungspuffer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS-T wurden 50 µl des zu testenden Zellkulturüberstandes (siehe 3.4.4) und parallel eine Verdünnungsreihe des VWF-Standards mit 0; 0,04; 0,08; 0,15; 0,32; 0,68 U/ml pro well pipettiert und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Wells mit PBS-T sechsmal gewaschen und der gebundene VWF mit 2,5 µg/ml Peroxidase-konjugierten anti-vWF-IgG aus der Ziege für 1,0 Std. bei RT und unter Lichtausschluss detektiert. Die Substratreaktion erfolgte durch TMB Single Solution (Invitrogen). Die Adsorption der Proben und des Standards wurden bei 450 nm zur Referenz von 570 nm mit einem Adsorptionsphotometer Sunrise, RC TW (Tecan, Schweiz) und der Software Magellan 3 (Tecan, Schweiz) gemessen und mit Hilfe der Standardgeraden in µg/ml umgerechnet.

0,05 M NaHCO₃-Puffer:

0,05 M NaHCO₃

mit dH₂O auffüllen

pH 9,5

PBS-T:

0,05 % Tween-20 in PBS

Absättigungspuffer:

10 % fötales Kälberserum in PBS

3.12.2 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Quantifizierung von Interleukin-8 (IL-8) in Zellkulturüberständen

Für die Quantifizierung von humanem IL-8 im Zellkulturüberstand von infizierten HPMEC wurde das Kit OptEIA™ Human IL-8 ELISA Set (Beckton Dickinson, USA) nach Anleitung des Herstellers verwendet. Vor der Inkubation der Zellkulturüberstände wurden sie 1:20 in Absättigungspuffer verdünnt. Die Absorption der Proben und des IL-8-Proteinstandards wurden mit einem Absorptionsphotometer (Sunrise, RC TW Tecan, Schweiz) bei 450 nm

(Referenz 570 nm) gemessen. Anhand der Standardgeraden wurden die Absorptions-Werte in µg/ml umgerechnet.

0,1 M NaHCO₃-Puffer:

0,1 M NaHCO₃

mit dH₂O auffüllen

pH 9,5

PBS-T:

0,05 % Tween-20 in PBS

Absättigungspuffer:

10 % fötales Kälberserum in PBS

3.12.3 Zytotoxizitäts-Test

Zur Bestimmung der Zellviabilität der HPMEC im Infektionsverlauf wurde ein Zytotoxizitäts-Test mit dem Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay (Promega, USA) nach Anleitung des Herstellers durchgeführt. Dieser Test ermöglicht die Bestimmung der Menge an Lactatdehydrogenase (LDH) im Überstand von Zellkulturen. Die Menge an Lactatdehydrogenase im Zellkulturüberstand nimmt mit dem Verlauf von Nekrose und Apoptose der Zellen zu (Anleitung des Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, USA). Zur Bestimmung der LDH-Menge nach Infektion der HPMEC wurden 50 µl des Zellkulturüberstandes von infizierten- oder inkubierten HPMEC für 30 min mit 50 µl des Substrat-Mix inkubiert. Nach Zugabe einer Stop-Lösung wurde von den Zellen freigesetzte LDH bei 490 nm in einem Adsorptionsphotometer (Sunrise, RC TW, Tecan, Schweiz; Software Magellan 3, Tecan, Schweiz) gemessen. Als Positiv-Kontrollen des LDH-Nachweises wurde eine 1:5000-Verdünnung einer im Kit enthaltenden bovinen Lactatdehydrogenase bestimmt. Eine weitere Kontrolle war die Bestimmung der LDH von HPMEC nach Lyse mit dem Detergenz Triton-X 100. Als Negativ-Kontrolle wurde die LDH-Menge von nicht-infizierten oder inkubierten HPMEC bestimmt.

3.13 Durchflusszytometrie

Zur Erstellung eines Rezeptorprofils von verschiedenen primären Endothelzellen wurden durchflusszytometrische Analysen durchgeführt. Dazu wurden die Rezeptorprofile von HPMEC und HUVEC in Passage 3 und Passage 15 verglichen. Die Endothelzellen wurden in Zellkulturschalen in der zu untersuchenden Passage bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht kultiviert (siehe 3.3.2). Nach dem Waschen der Zellen mit Hepes BSS (Promocell, Deutschland) wurden sie mit 0,2 % EDTA in PBS vom Boden der Zellkulturschale abgelöst. Der Chelatbildner EDTA besitzt eine hohe Affinität für zweifach geladene Kationen, wie Ca^{2+} . Der Kalziumentzug löst Zellanhebungsstrukturen und führt zur Vereinzelung der Zellen (Boxberger, 2007). Die Wirkung des EDTA wurde mit Zellkulturmedium abgestoppt und die Zellsuspension bei 900 x g für 10 min zentrifugiert (Haereus, Biofuge 15R). Das Zellsediment wurde in 1 ml PBS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.3.5). Pro Ansatz wurden 4×10^4 Zellen entnommen und das Volumen auf 100 µl mit PBS mit 1 % FCS aufgefüllt. Die Zellen wurden mit 0,1 µg/ml des primären Antikörpers für 20 min bei 4 °C inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS mit 1 % FCS wurde das Zellsediment in 100 µl PBS mit 1 % FCS resuspendiert und mit 6,7 µg/ml anti-Kaninchen IgG Alexa Fluor® 488-konjugiert aus der Ziege oder anti-Maus IgG Alexa Fluor® 488-konjugiert aus der Ziege (je nach Spezies des primären Antikörpers) für 20 min bei 4 °C unter Lichtausschluss inkubiert. Nach erneutem dreimaligem Waschen wurde das Zellsediment in 300 µl 1 % Paraformaldehyd in PBS resuspendiert und in FACS (=fluorescence activated cell sorting) -Röhrchen (Becton Dickinson) überführt. Nach 1 Std. Inkubation bei 4 °C unter Lichtausschluss wurden die Proben am Durchflusszytometer (FACSCalibur, Cell Quest Pro, Becton Dickinson) analysiert.

Die durchflusszytometrische Analyse wurde mit folgenden Antikörpern durchgeführt:

- anti-VWF IgG aus der Maus
- anti-Pecam-1 (*platelet endothelial cell adhesion molecule*) IgG aus der Maus
- anti-PAF-R (*platelet activating factor receptor*) IgG aus dem Kaninchen
- anti-LYVE-1 (*Lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1*) IgG aus dem Kaninchen
- anti-uPAR (*urokinase-type plasminogen activating receptor*) IgG aus der Maus
- anti- β_1 -Integrin IgG aus der Maus
- anti- β_3 -Integrin IgG aus der Maus
- anti- $\alpha_v\beta_3$ -Integrin IgG aus der Maus

- anti- α_2 -Integrin IgG aus der Maus
- anti-Fibrinogen IgG aus dem Kaninchen

Das Prinzip der Durchflusszytometrie basiert auf der Detektion von emittiertem Licht der Fluoreszenzsignale der an der Zelle gebundenen Antikörpern (siehe Abb. 7 A). Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare gesaugt und passiert einen Laserstrahl (siehe Abb. 7 A). Die von den Zellen gestreute Emission des Laserlichtes wird mit zwei Detektoren nachgewiesen (siehe Abb. 7 A). Die Menge und der Winkel des auf die Detektoren treffenden Lichtes korreliert mit der Größe und Zusammensetzung der Zelle. Das Vorwärtsstreulicht (FSC = *Forward Scatter*) misst die Beugung des Lichts im flachen Winkel und ist vom Volumen der Zelle abhängig. Auf Grund dessen beschreibt das Vorwärtsstreulicht die Größe der Zelle bzw. des Zellkomplexes. Die Struktur und Granularität einer Zelle wird durch das Seitwärtsstreulicht (SSC = *Sidewards Scatter*) gemessen. Es misst die Brechung des Lichts im rechten Winkel, die von der Granularität im Inneren der Zelle beeinflusst wird (siehe Abb. 7 A). Die Messdaten werden in Graphen dargestellt (siehe Abb. 7 B), Teilmengen (*gates*) herausgefiltert und für die Berechnung des GMFI (*geometric mean fluorescence intensity*) x *gated events* verwendet. Der GMFI x *gated events* bezeichnet die detektierte Fluoreszenz einer gefilterten Zellmenge.

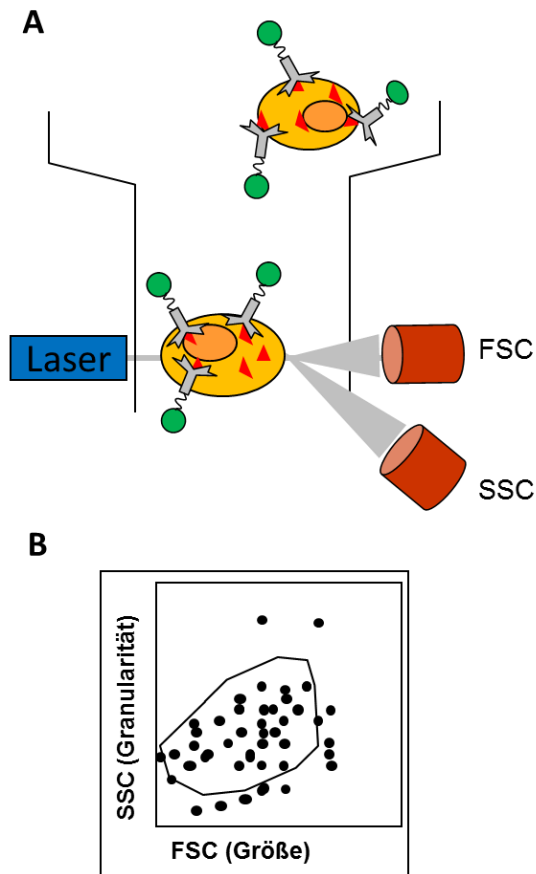


Abbildung 7: Modell der Funktionsweise der Durchflusszytometrie A) Fluoreszenzmarkierte Zellen passieren einen Laserstrahl. B) Das emittierte Licht wird von zwei Detektoren (FSC und SSC) aufgefangen und grafisch dargestellt.

3.14 Mikroarray-Analyse

HPMEC wurden in Zellkulturschalen ausgesät und bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht kultiviert (siehe 3.3.2). und mit *S. pneumoniae* st35A bzw. st35A Δ ply mit einer MOI 50 für 4,5 Std. infiziert. Im Anschluss daran wurden die infizierten Zellen und die nicht-infizierten Zellen mit einem Zellschaber (TPP) vom Boden der Zellkulturschalen abgelöst. Die Zellen wurden in 350 μ l RLT Puffer des RNeasy Mini Kit (Qiagen) resuspendiert und die RNS mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) isoliert. Die Isolierung und Aufreinigung der RNS, die Qualitätsanalyse, die cDNA-Synthese, die Hybridisierung mit dem Chip sowie die weitere Prozessierung und Analyse des Microarray wurde im Rahmen einer Kooperation von der Plattform „Genexpressionsanalyse“ des HZI Braunschweig unter Leitung von Dr. Robert Geffers durchgeführt.

Die Qualitätskontrolle der RNS erfolgte mit dem Agilent bioanalyzer 2100 (RNA 6000 nano chip). Die RNS wird in ein Gel eines Minikapillarsystems injiziert und dann elektrisch aufgetrennt. Liegt die RNS intakt vor, ergeben sich zwei Banden, die 28 S und 18 S-Bande. Ein 2:1-Verhältnis der Fluoreszenzintensitäten der 28 S und der 18 S-rRNS-Bande (ribosomale RNS) zeigt an, dass die mRNA (*messenger* RNS) vorhanden und nicht degradiert ist (Anleitung des Agilent bioanalyzer 2100). Für die cDNS-Synthese wurde ausschließlich intakte RNS verwendet. Zur Bestimmung der Genexpression der infizierten und nicht-infizierten Zellen wurde die cDNS mit HG U133 Plus 2.0 Genchips (Affymetrix) hybridisiert. Die Chips enthalten Oligonukleotide, die 54.000 Gene des humanen Genoms repräsentieren. Nach der Hybridisierung wurden die Chips mit Biotin-markierten Nukleotiden in der Affymetrix GeneChip fluidic station (FS-400) gewaschen und mit Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin (SA-PE) inkubiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem Affymetrix GeneChip Scanner (GCS3000). Die Rohdaten der Microarray-Analyse wurden mit der GCOS 1.2 Software ausgewertet und in Signalintensitäten umgewandelt. Die Auswertung der Signalintensitäten erfolgte mit der Software GeneSpring GX 11.5 (Agilent Technologies) und umfasste folgende mathematische Berechnungen: 1. Die Rohdaten wurden basierend auf dem RMA-Algorithmus normalisiert und logarithmiert. 2. Die einzelnen Signalintensitäten eines Gens wurden zum Mittelwert zusammengefasst. 3. Aus den Signalintensitäten wurden dann die relativen Signalintensitäten im Vergleich zum Median aller Proben bestimmt. 4. Um Hintergrundsignale raus zu filtern wurde ein Percentilfilter verwendet. Einzelne Gene, deren Signalintensität das 20er Percentil nicht überschreitet, werden in den folgenden Analysen nicht berücksichtigt. 5. Zur weiteren statistischen Analyse wurden die Proben anhand ihres biologischen Ursprungs (nicht-infiziert, infiziert mit *S. pneumoniae* st35A und infiziert mit *S. pneumoniae* st35A Δ ply) gruppiert. Im Anschluss wurde eine Multivarianzanalyse durchgeführt. Als signifikant reguliert galten Gene, die eine mindestens dreimal so hohe oder niedrige Genexpression im Vergleich zum Mittelwert der nicht-infizierten Zellen und eine Signifikanz von $p < 0,05$ aufwiesen.

3.15 Real time PCR

Zur Evaluierung der Ergebnisse der Mikroarrayanalyse wurde eine Real time Polymerase-Kettenreaktionen des Interleukin-8-Gens durchgeführt. Hierfür wurden HPMEC bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht in Zellkulturschalen (Durchmesser 6 cm) kultiviert (siehe 3.3.2). In jeder Zellkulturschale befanden sich zwei Deckgläschen, die nach der

Infektion aus der Zellkulturschale genommen wurden und fluoreszenzmikroskopisch analysiert wurden. Dadurch wurde die Adhärenz und Internalisierung der Pneumokokken in den Zellkulturinfektionen visuell überprüft. Nach der Infektion der Zellen mit *S. pneumoniae* st35A bzw. *S. pneumoniae* st35A Δ ply mit einer MOI 50 für 2,5 Std. wurden die Zellen mit Infektionsmedium gewaschen, mit einem Zellschaber (TPP) vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und in 350 μ l eiskaltem RLT-Puffer des RNeasy Mini Kits aufgenommen.

Die RNS-Aufreinigung mit dem RNeasy Mini Kit (Qiagen) und die cDNS-Synthese wurden von Astrid Dröge (Abt. Medizinische Mikrobiologie, HZI, Braunschweig) durchgeführt.

Die Durchführung der Real time PCR erfolgte im Rahmen einer Kooperation durch die Plattform „Genexpressionsanalyse“ des HZI Braunschweig unter Leitung von Dr. Robert Geffers.

Die Auswertung der Analyse wurde von PD Dr. Simone Bergmann (Institut für Mikrobiologie, Technische Universität Braunschweig) durchgeführt.

3.16 Statistische Auswertung

Sämtliche Experimente wurden mindestens dreimal unabhängig voneinander durchgeführt, jeder Versuch in Dreifachwerten. Die Signifikanz der Daten wurde mit dem *students t-test* bestimmt. Eine Signifikanz von $p < 0,05$ wurde als statistisch signifikant erachtet.

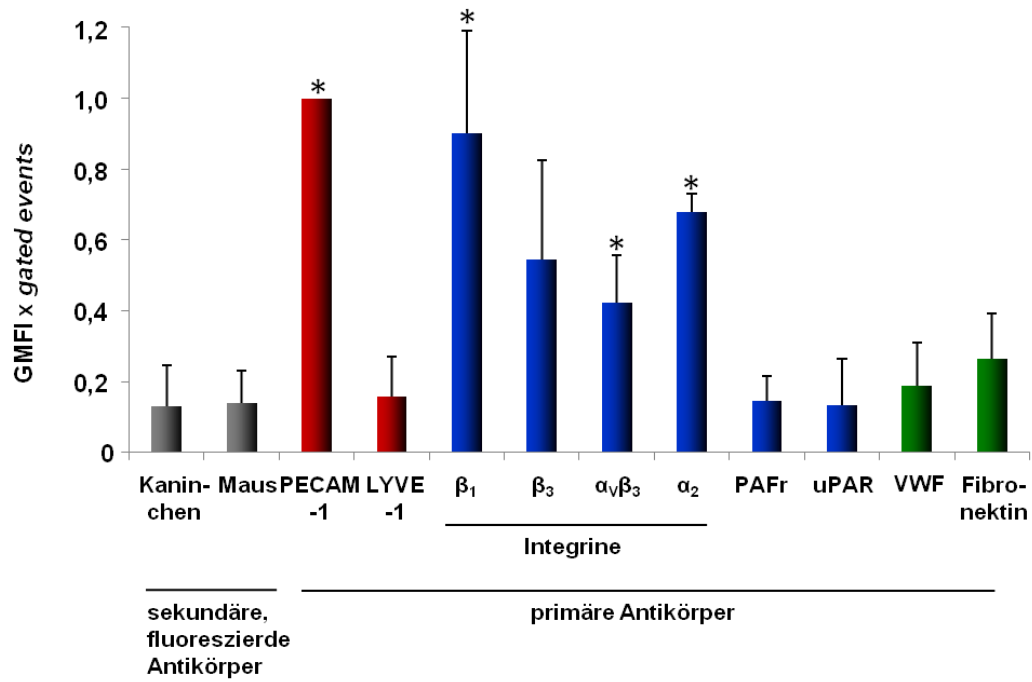
4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung primärer, humaner Endothelzellen

Die in dieser Arbeit gestellten infektionsbiologischen Fragestellungen wurden anhand von differenzierten, primären Endothelzellen untersucht. Für die Untersuchung der Interaktion von Pneumokokken mit der Luft-Blut-Schranke wurden die primären, humanen, mikrovaskulären Lungenendothelzellen (HPMEC) verwendet. Zum Vergleich von Differenzierungsmarkern und Proteinrezeptoren auf der Zelloberfläche dieser humanen Endothelzellen mit humanen Endothelzellen aus einem anderen Gewebe, wurden zusätzlich makrovaskuläre Endothelzellen der Nabelschurvene (HUVEC) verwendet. Bei HUVEC handelt es sich um ein vielfach angewendetes Endothelzell-Modellsystem. Da sich unter *in-vitro*-Zellkulturbedingungen der Differenzierungsstatus von primären Endothelzellen in der Regel nach wenigen Passagen ändert (Pelzer, 2009), wurde die Expression von unterschiedlichen Differenzierungsmarkern und Proteinrezeptoren auf der Zelloberfläche von HPMEC und HUVEC jeweils in früher Passage (Passage 3) und in später Passage (Passage 15) untersucht. Als Differenzierungsmarker auf der Oberfläche beider Endothelzellen wurde die Expression des *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) und des *lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1) bestimmt. Außerdem wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren β_1 -Integrin, β_3 -Integrin, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, α_2 -Integrin, des *platelet activating factor receptor* (PAFr) sowie des *urokinase plasminogen activating receptor* (uPAR) auf der Oberfläche der Endothelzellen untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von extrazellulärem Fibronektin und Von Willebrand Faktor (VWF) auf der Oberfläche der beiden Endothelzelltypen bestimmt. Zum Nachweis der Differenzierungsmarker und Oberflächenproteine wurden die Endothelzellen nach Kultivierung bis zur Passage 3 bzw. 15 mit Antikörpern gegen die Proteine inkubiert, durch Inkubation mit ALEXA 488-konjugierten Zweitantikörpern markiert und die Fluoreszenzsignale in durchflusscytometrischen Analysen untersucht.

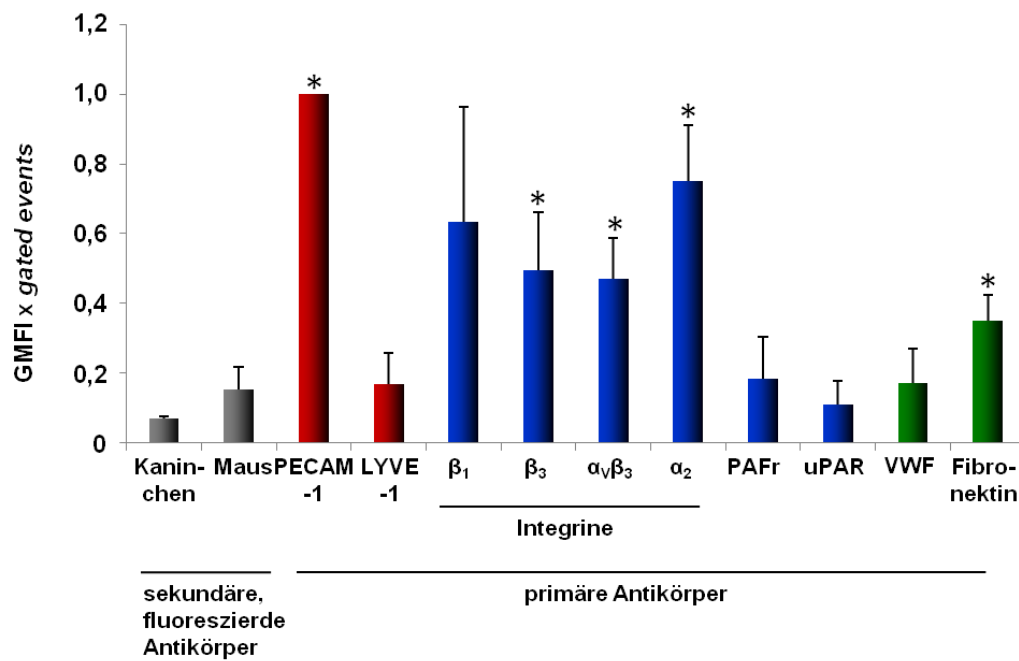
A

HPMEC Passage 3



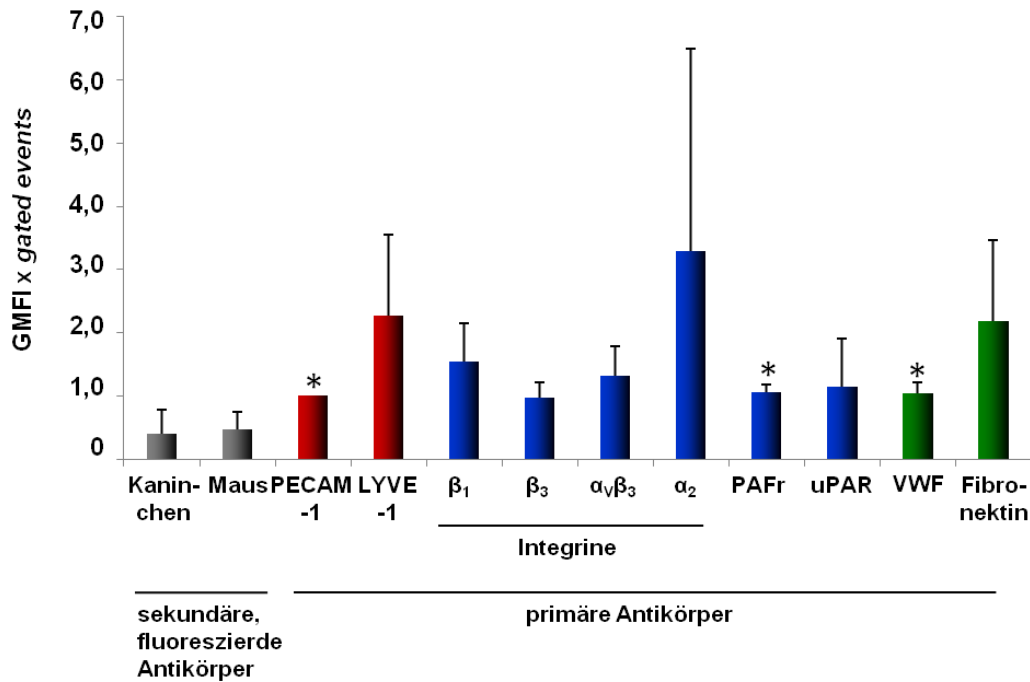
B

HUVEC Passage 3



C

HPMEC Passage 15



D

HUVEC Passage 15

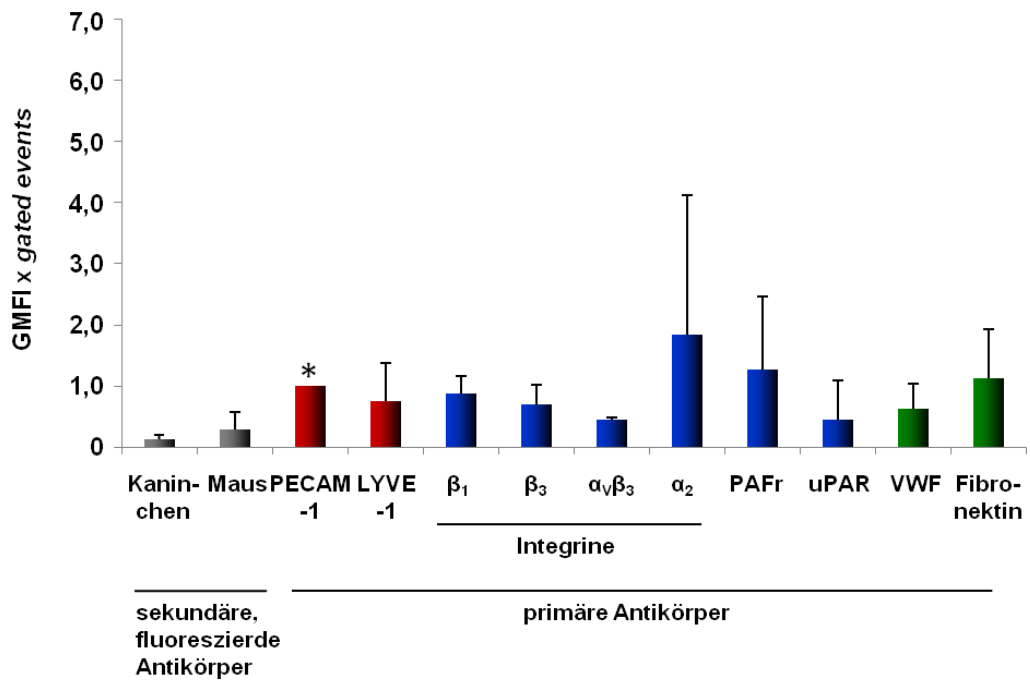


Abbildung 8: Expression spezifischer Proteine und Oberflächenrezeptoren von HPMEC und HUVEC in Passage 3 und 15. Die Endothelzellen HPMEC und HUVEC wurden in Passage 3 (A, B) und 15 (C, D) mit spezifischen Antikörpern inkubiert. Die

Antikörper detektierten folgende Proteine: *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1), *lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1), β_1 -Integrin, β_3 -Integrin, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, α_2 -Integrin, *platelet activating factor receptor* (PAFr), von Willebrand Faktor (VWF), *urokinase plasminogen activating receptor* (uPAR) und extrazelluläres Fibronektin. Die Detektion der Proteine auf der Zelloberfläche erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Zweitantikörpern. Die Fluoreszenzsignale wurden durchflusszytometrisch bestimmt. Zur Kontrolle wurden HPMEC und HUVEC jeweils mit den Zweitantikörpern inkubiert. Zur Analyse wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und aus den Experimenten der Mittelwert und die Standardabweichung der Fluoreszenzintensität für 10.000 Zellen (*geometric mean fluorescence intensity* (GMFI) x *gated events*) berechnet. Die dargestellten Diagramme zeigen die GMFI x *gated events* in Relation zu dem Endothelzellmarker PECAM-1 (Faktor 1,0). Die Signale der sekundären, fluoreszierenden Antikörper beschreiben unspezifische Hintergrundsignale. *) Signifikanz der Fluoreszenzintensität von 10.000 Zellen (GMFI x *gated events*) im Bezug zur Fluoreszenzintensität der sekundären, fluoreszierenden Antikörpern ($p < 0,05$).

Die Ergebnisse der Durchflusszytometrie der Endothelzellen in Passage 3 zeigten eine vergleichbare Proteinexpression bei HPMEC im Vergleich zu HUVEC (Abb. 8 A und B). Bei beiden Endothelzelltypen wurde PECAM-1 signifikant auf der Oberfläche der Zellen nachgewiesen (Abb. 8 A und B). Die Werte der detektierten Oberflächenproteine sind in Relation zu der Expression des PECAM-1 angegeben (Faktor 1,0 für PECAM-1). Auf der Oberfläche der Lungenendothelzellen wurden vergleichbare Proteinmengen von PECAM-1 und β_1 -Integrin mit einem Faktor von $0,9 \pm 0,29$ detektiert (Abb. 8 A). Die Proteinmenge der β_1 -Integrine mit $0,63 \pm 0,33$ auf der Oberfläche der HUVEC war etwas geringer als die Expression des PECAM-1 (Abb. 8 B). Die Hintergrundfluoreszenz der sekundären Antikörper war im Vergleich zu PECAM-1 bei beiden Endothelzelltypen sehr gering mit $0,13 \pm 0,12$ für den Kaninchen-spezifischen Antikörper und $0,14 \pm 0,09$ für den Maus-spezifischen Antikörper bei HPMEC und $0,07 \pm 0,004$ für den Kaninchen-spezifischen Antikörper und $0,15 \pm 0,07$ für den Maus-spezifischen Antikörper bei HUVEC (Abb. 8 A und B). Die Expression von α_2 -Integrinen wurde in vergleichbarer Menge wie bei β_1 -Integrin detektiert (Faktor $0,68 \pm 0,05$ bei HPMEC und Faktor $0,75 \pm 0,16$ bei HUVEC). In beiden Zelltypen erreichte die detektierte Menge an β_3 -Integrinen mit einem Faktor von $0,54 \pm 0,28$ bei HPMEC und $0,5 \pm 0,17$ bei HUVEC und $\alpha_v\beta_3$ -Integrinen mit einem Faktor von $0,42 \pm 0,13$ bei HPMEC und $0,47 \pm 0,12$ bei HUVEC nur circa 50 % der PECAM-1-Proteinmenge (Abb. 8 A und B).

Die Expression von LYVE-1, PAFr, VWF und uPAR auf der Oberfläche der Endothelzellen war geringer als die Expression von PECAM-1 und erreichte Werte im Bereich der

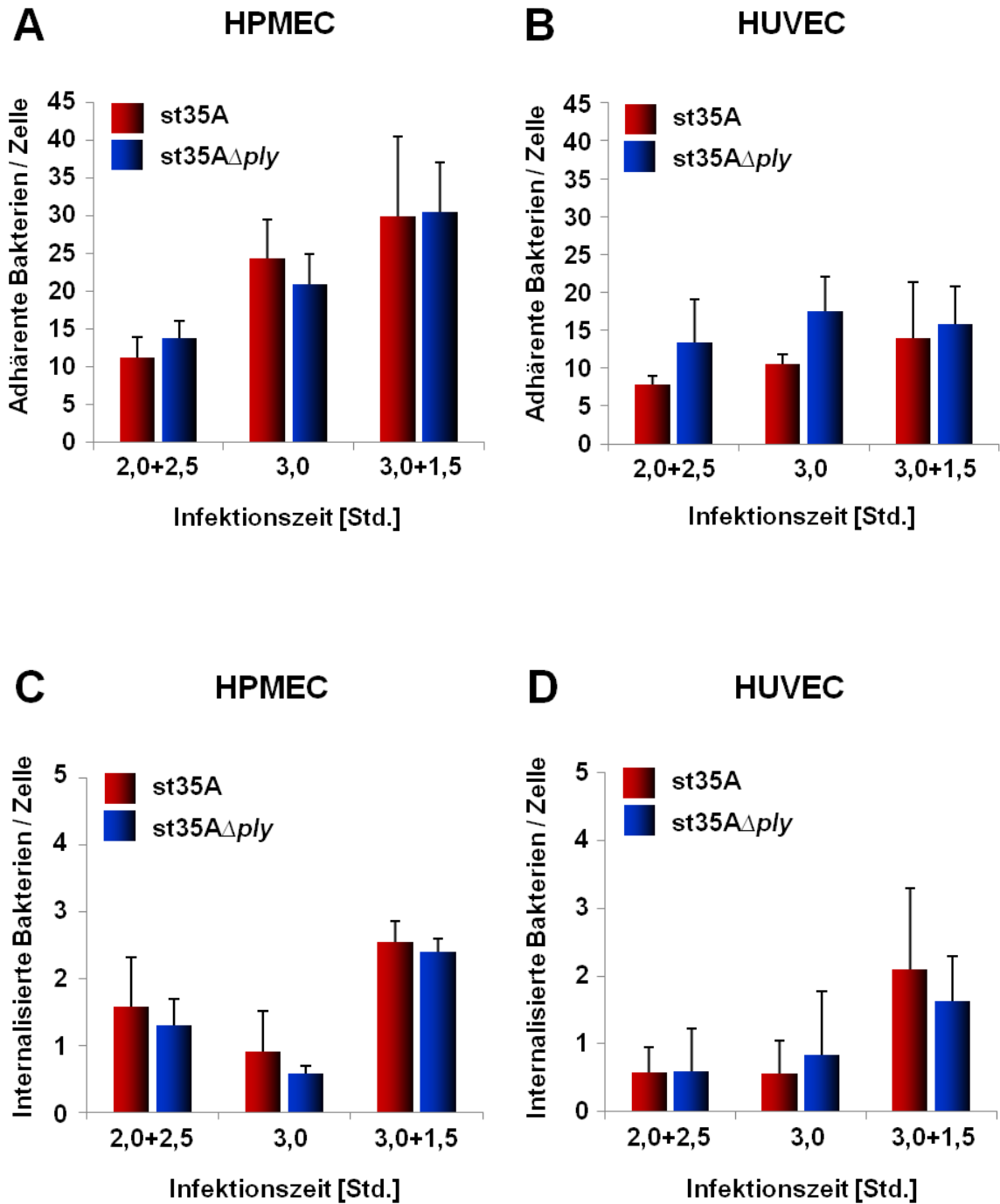
unspezifischen Antikörper-Bindung. Die Werte betragen $0,15 \pm 0,07$ (HPMEC) bzw. $0,18 \pm 0,12$ (HUVEC) für PAFr, $0,16 \pm 0,11$ (HPMEC) bzw. $0,17 \pm 0,09$ (HUVEC) für LYVE-1, $0,19 \pm 0,12$ (HPMEC) bzw. $0,17 \pm 0,1$ (HUVEC) für VWF und $0,13 \pm 0,13$ (HPMEC) bzw. $0,11 \pm 0,07$ (HUVEC) für uPAR (Abb. 8 A und B). Bei beiden Endothelzelltypen konnte eine geringe Expression von extrazellulärem Fibronektin auf der Oberfläche der Zellen detektiert werden ($0,26 \pm 0,13$ bei HPMEC und $0,35 \pm 0,07$ bei HUVEC). Die Analysen der Endothelzellen in Passage 15 resultierten in teilweise stark veränderten Expressionsprofilen der untersuchten Zellen. Darüber hinaus sind im Gegensatz zur frühen Passage Unterschiede in der Expression einzelner Proteine zwischen HUVEC und HPMEC zu erkennen (Abb. 8 C und D). Der Endothelzellmarker PECAM-1 wurde bei HPMEC und HUVEC in Passage 15 im Vergleich zu den anderen Proteinen in geringerer Menge exprimiert (Abb. 8 A und B). Zum Vergleich der Profile in Passage 15 mit den Expressionsprofilen der Passage 3 sind die Werte der Proteine in Relation zu der Expression des PECAM-1 angegeben (Faktor 1,0 für PECAM-1). Die Werte der Hintergrundfluoreszenz der sekundären Antikörper waren geringer als die Werte für PECAM-1 ($0,4 \pm 0,39$ (HPMEC) bzw. $0,12 \pm 0,07$ (HUVEC) für den Kaninchen-spezifischen Antikörper und $0,47 \pm 0,28$ (HPMEC) bzw. $0,29 \pm 0,27$ (HUVEC) für den Maus-spezifischen Antikörper). Darüber hinaus sind diese Werte der unspezifischen Bindung der sekundären Antikörper höher als in der Analysen der frühen Passagen. Im Vergleich zur Expression des PECAM-1 war die Expression von LYVE-1 in beiden Endothelzelltypen sehr hoch (Faktor $2,27 \pm 1,29$ bei HPMEC und $0,74 \pm 0,62$ bei HUVEC). In Passage 15 wurde das α_2 -Integrin in beiden Zelltypen am stärksten exprimiert (Faktor $3,28 \pm 3,21$ bei HPMEC und $1,84 \pm 2,28$ bei HUVEC). Die Expression von extrazellulärem Fibronektin war mit $2,12 \pm 1,28$ in HPMEC und mit $1,12 \pm 0,81$ in HUVEC höher als die Expression von PECAM-1. Die Proteinmengen von PAFr, VWF, uPAR, β_1 -Integrin, β_3 -Integrin und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin lagen bei beiden Endothelzelltypen im Bereich der Expression von PECAM-1 ($1,06 \pm 0,11$ (HPMEC) bzw. $1,26 \pm 1,2$ (HUVEC) für PAFr $1,04 \pm 0,16$ (HPMEC) bzw. $0,63 \pm 0,41$ (HUVEC) für VWF, $1,15 \pm 0,78$ (HPMEC) bzw. $0,45 \pm 0,65$ (HUVEC) für uPAR, $1,53 \pm 0,61$ (HPMEC) bzw. $0,87 \pm 0,3$ (HUVEC) für β_1 -Integrin, $0,97 \pm 0,24$ (HPMEC) bzw. $0,67 \pm 0,33$ (HUVEC) für β_3 -Integrin und $1,31 \pm 0,46$ (HPMEC) bzw. $0,45 \pm 0,04$ (HUVEC) für $\alpha_v\beta_3$ -Integrin). Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die Endothelzellen HPMEC und HUVEC ein vergleichbares Proteinexpressionsprofil in niedrigen Kulturpassagen aufweisen, während nach häufiger Subkultivierung die Proteinexpression beider Endothelzelltypen deutlich voneinander abweicht. In den weiteren Infektionsstudien wurden die HPMEC nur in niedrigen Kulturpassagen im differenzierten Status verwendet.

4.2 *In-vitro*-Infektionsstudien von Pneumokokken mit humanen Endothelzellen

Die Kapillargefäße der humanen Lunge werden von mikrovaskulären Lungenendothelzellen ausgekleidet. Sie bilden die Grenzschicht zwischen dem Lungengewebe und dem Blutstrom (Aird, 2007). Im Verlauf einer invasiven Infektion müssen Pneumokokken die Luft-Blut-Schranke überwinden, um in das Blutsystem zu gelangen. Zur Charakterisierung der direkten Interaktion von *S. pneumoniae* mit Lungenendothelzellen wurden *in-vitro*-Zellkulturinfektionen durchgeführt. Die Adhärenz von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply an primäre, differenzierte HPMEC und die bakterielle Internalisierung in diese Zellen wurde in Versuchen mit unterschiedlichen Infektionszeiten und Bakterienmengen (Multiplizität der Infektion, *multiplicity of infection*, MOI) untersucht. Die Infektionsexperimente wurden zum Vergleich parallel mit HUVEC durchgeführt.

4.2.1 Interaktion von Pneumokokken mit Endothelzellen nach unterschiedlichen Infektionszeiten

Zur Bestimmung von Adhärenz- und Internalisierungsraten von Pneumokokken wurden HPMEC und HUVEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply mit einer MOI 50 infiziert (2,0 Std. + 2,5 Std. bzw. 3,0 Std. + 1,5 Std.). Zur Verringerung von Zellschäden durch bakterielle Toxine wurden die Zellen nach 2,0 Std. bzw. 3,0 Std. mit Infektionsmedium gewaschen. Dadurch wurden nicht-adhärente Pneumokokken entfernt. Die anschließende Inkubationszeit von 2,0 Std. bzw. 1,5 Std. ermöglichte eine weitere Internalisierung adhärenter Pneumokokken in die Zellen. Im Anschluss wurden Immunfluoreszenzfärbungen mit Pneumokokken-spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern durchgeführt und die Menge an adhären und internalisierten Pneumokokken fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Diese Quantifizierungsmethode unterscheidet nicht zwischen lebenden und toten Pneumokokken. In weiteren Experimenten wurden die Zellen nach der Infektion lysiert und auf Blutagarplatten kultiviert. Dies ermöglichte die Quantifizierung der internalisierten, lebenden Pneumokokken von jeweils $2,0 \times 10^5$ Endothelzellen.



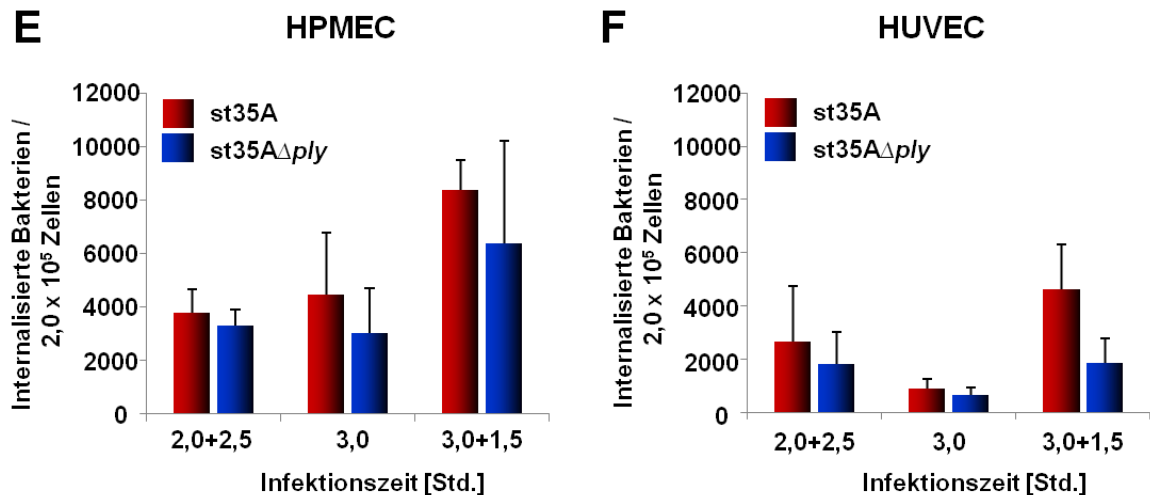


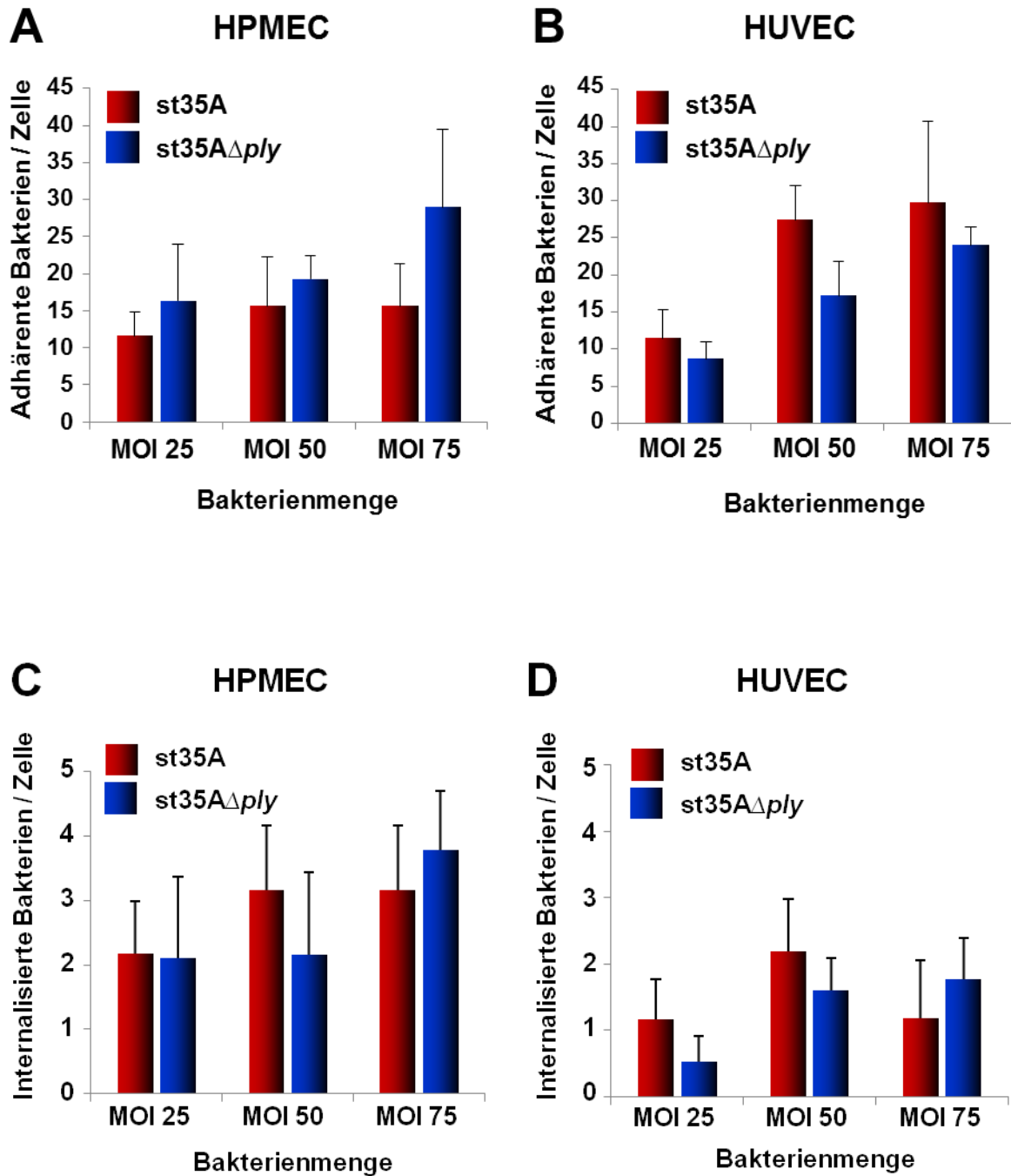
Abbildung 9: Pneumokokkenadhärenz und -internalisierung in HPMEC und HUVEC nach unterschiedlichen Infektionszeiten. Die Interaktion von Pneumokokken (*S. pneumoniae* st35A (rot) und *S. pneumoniae* st35A Δ ply (blau)) wurde in *in-vitro*-Zellkulturinfektionen bei verschiedenen Infektionszeiten durch Immunfluoreszenzfärbung, sowie Lyse der Zellen und Kultivierung auf Blutagar untersucht. Die Quantifizierung der adhärennten und internalisierten Pneumokokken pro Zelle erfolgte durch fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen (A-D). Die Anzahl an internalisierten, lebenden Pneumokokken wurde durch Quantifizierung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) bestimmt (E und F). **A)** Adhärenz des Serotyp 35A und des Serotyp 35A Δ ply an HPMEC. **B)** Adhärenz des Wildtyp und der Mutante an HUVEC. **C)** Internalisierung von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply in HPMEC. **D)** Internalisierung des Wildtyp und der Mutante in HUVEC. **E)** Anzahl internalisierter, lebender Pneumokokken in 2×10^5 HPMEC (Serotyps st35A und st35A Δ ply). **F)** Internalisierte, lebende Pneumokokken in 2×10^5 HUVEC (Serotyps st35A und st35A Δ ply). Die Diagramme zeigen die Mittelwerte der adhärennten und internalisierten Bakterien nach der jeweiligen Infektionszeit. Die Mittelwerte und Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Die Anzahl adhärennter Pneumokokken an HPMEC war bei beiden Pneumokokkenstämmen vergleichbar und stieg von 11 ± 3 Bakterien (*S. pneumoniae* st35A) bei 2,0 Std. + 2,5 Std. auf 30 ± 11 Bakterien bei 3,0 Std. + 1,5 Std. und 14 ± 2 Pneumokokken (*S. pneumoniae* st35A Δ ply) bei 2,0 Std. + 2,5 Std. auf 31 ± 7 Pneumokokken bei 3,0 Std. + 1,5 Std. (Abb. 9 A). Die Adhärenzzahlen des Wildtyps an Endothelzellen der Nabelschnur stiegen von 8 ± 1 Wildtyp-Pneumokokken bei 2,0 Std. + 2,5 Std. auf 14 ± 8 Wildtyp-Pneumokokken bei 3,0 Std. + 1,5 Std. und 13 ± 6 Pneumolysin-defiziente Pneumokokken bei 2,0 Std. + 2,5 Std. auf 16 ± 5 Pneumolysin-defiziente Pneumokokken bei 3,0 Std. + 1,5 Std. (Abb. 9 B). Beide

Pneumokokkenstämme zeigten in fluoreszenzmikroskopischen Analysen eine geringe, aber ebenfalls zeitabhängige Internalisierung in HPMEC und HUVEC. Die Anzahl internalisierter Pneumokokken in HPMEC war mit 3 ± 1 Wildtyp-Pneumokokken und 2 ± 0 Pneumolysin-defizienten Pneumokokken bei 3,0 Std. + 1,5 Std. am höchsten (Abb. 9 C). In HUVEC internalisierten weniger Bakterien als in HPMEC. Die höchsten Internalisierungszahlen wurden bei 3,0 Std. + 1,5 Std. quantifiziert (2 ± 1 *S. pneumoniae* st35A und 2 ± 1 *S. pneumoniae* st35A Δ ply) (siehe Abb. 9 D). Die Anzahl internalisierter Pneumokokken wurde zusätzlich in Zellkulturinfektionen nach unterschiedlichen Infektionszeiten durch Lyse der Zellen und Kultivierung auf Blutagar untersucht. Im Unterschied zur Immunfluoreszenz-Methode können ausschließlich die lebenden, internalisierten Pneumokokken quantifiziert werden. Die Quantifizierung erfolgte durch Auszählung der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE). Die Anzahl internalisierter Pneumokokken in HPMEC erreichte bei 3,0 Std. + 1,5 Std. ein Maximum von 8358 ± 1148 *S. pneumoniae* st35A/2 x 10⁵ Zellen und 6375 ± 3837 *S. pneumoniae* st35A Δ ply/2 x 10⁵ Zellen (Abb. 9 E). Die höchsten Internalisierungszahlen in HUVEC betrugen 4630 ± 1671 Wildtyp-Pneumokokken/2 x 10⁵ Zellen und 1853 ± 923 Pneumokokken-Mutanten/2 x 10⁵ Zellen und wurden bei 3,0 Std. + 1,5 Std. erreicht (Abb. 9 F).

4.2.2 Adhärenz und Internalisierung von Pneumokokken in HPMEC und HUVEC nach Infektion mit unterschiedlicher MOI

Zur Charakterisierung der Interaktion von *S. pneumoniae* mit humanen Endothelzellen in Abhängigkeit von der im Infektionsexperiment verwendeten Bakterienmenge (MOI) wurden HPMEC und HUVEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply für 3,0 Std. + 1,5 Std. mit einer MOI von 25, 50 und 75 infiziert. Die Quantifizierung der adhärennten und internalisierten Pneumokokken erfolgte wie in den Untersuchungen zur Interaktion von Pneumokokken bei unterschiedlichen Infektionszeiten (siehe 4.2.1).



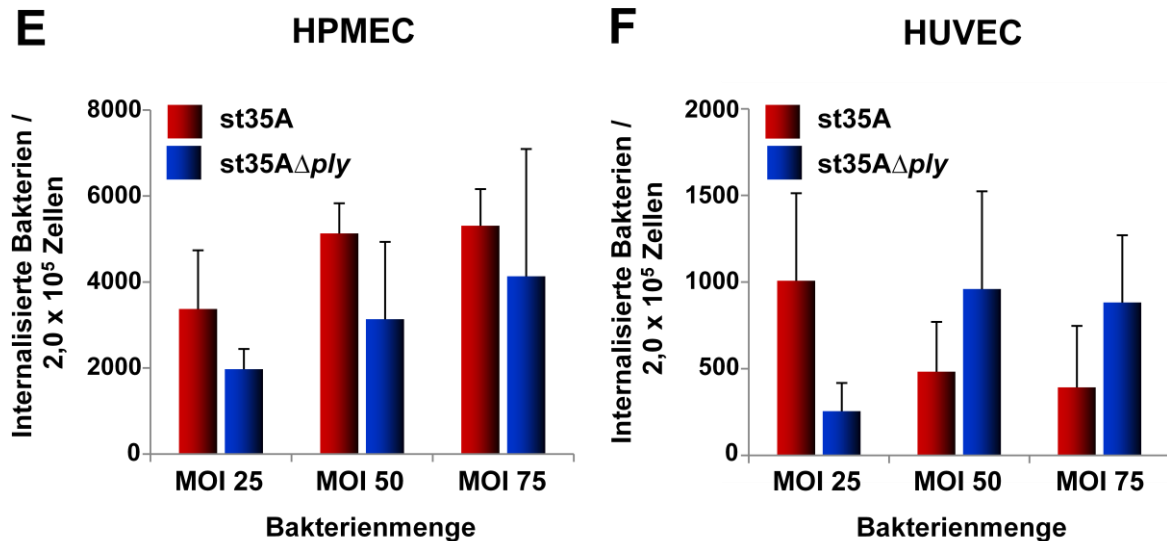


Abbildung 10: Interaktion von Pneumokokken mit humanen Endothelzellen nach Infektion mit unterschiedlicher MOI. Die Anzahl adhärenter (A und B) und internalisierter (C-F) Pneumokokken (*S. pneumoniae* st35A (rot) und *S. pneumoniae* st35A Δ ply (blau)) wurde nach Zellkulturinfektionen von HPMEC und HUVEC mit Pneumokokken unterschiedlicher MOI (MOI 25, 50 und 75) quantifiziert. Zur Quantifizierung wurde eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt und die adhärenenten und internalisierten Bakterien fluoreszenzmikroskopisch bestimmt (A-D). Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte wie in den Untersuchungen zur Interaktion von Pneumokokken bei unterschiedlichen Infektionszeiten (siehe 4.2.1). Internalisierte, lebende Pneumokokken wurden durch Lyse der infizierten Zellen, Kultivierung auf Blutagar und Auszählen der Kolonie-bildenden Einheiten (KBE) quantifiziert (E und F). Die Mittelwerte der adhärenenten und internalisierten Bakterien und die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimenten berechnet.

Die Menge adhärenenten Pneumokokken an HPMEC stieg von 12 ± 3 *S. pneumoniae* st35A bei MOI 25 auf 16 ± 6 Wildtyp-Pneumokokken bei MOI 75 und 16 ± 8 *S. pneumoniae* st35A Δ ply bei MOI 25 auf 29 ± 11 Pneumolysin-defiziente Pneumokokken bei MOI 75 (Abb. 10 A). Die Zahl adhärenenten Pneumokokken an HUVEC stieg wie bei den HPMEC von 11 ± 4 Pneumokokken des Serotyp 35A bei MOI 25 auf 30 ± 11 Pneumokokken des Serotyp 35A bei MOI 75 und 9 ± 2 Pneumolysin-defiziente Pneumokokken bei MOI 25 auf 24 ± 2 Pneumolysin-defiziente Pneumokokken bei MOI 75 (Abb. 10 B). Die Anzahl internalisierter Pneumokokken in HPMEC und HUVEC war deutlich geringer als die Anzahl der adhärenenten Bakterien. In HPMEC internalisierten bei MOI 75 3 ± 1 Pneumokokken des Wildtyps und 4 ± 1 der Pneumokokkenmutante (Abb. 10 C). In HUVEC internalisierten weniger Pneumokokken als in HPMEC (maximal 2 ± 1 *S. pneumoniae* st35A bei MOI 50 und 2 ± 1

S. pneumoniae st35AΔply bei MOI 75 (Abb. 10 D). Die Menge internalisierter Pneumokokken bei unterschiedlichen MOI wurde zusätzlich zur fluoreszenzmikroskopischen Quantifizierung in Plattierungsanalysen untersucht. Durch Plattierung der lysierten, infizierten Zellen auf Blutagar wurde die Anzahl der lebenden, internalisierten Bakterien bestimmt. Die Quantifizierung wurde wie in den Infektionsexperimenten zur Interaktion von Pneumokokken bei unterschiedlichen Infektionszeiten (4.2.1) durchgeführt. Die Menge der internalisierten Pneumokokken in HPMEC betrug bei MOI 25 nur die Hälfte im Vergleich zur MOI 75. Bei MOI 75 erreicht die Anzahl der internalisierten Bakterien ein Maximum von 5310 ± 851 *S. pneumoniae* st35A/2,0 x 10⁵ Zellen und 4133 ± 2960 *S. pneumoniae* st35AΔply/2,0 x 10⁵ Zellen. In HUVEC waren die Zahlen der internalisierten Bakterien deutlich geringer als in HPMEC. Die Internalisierungsrate erreichte beim Wildtyp ein Maximum von 1008 ± 506 Pneumokokken/2,0 x 10⁵ Zellen bei MOI 25 und bei der Pneumolysinmutante ein Maximum von 960 ± 564 Pneumokokken/2,0 x 10⁵ Zellen bei MOI 50.

4.2.3 Visualisierung der Menge adhärenter und internalisierter Pneumokokken in HPMEC

In *in-vitro*-Zellkulturinfektionen wurden HPMEC mit *S. pneumoniae* st35AΔply für 3,0 Std. + 1,5 Std. mit einer MOI von 50 infiziert. Die adhärenten und internalisierten Pneumokokken wurden in der Immunfluoreszenzfärbung mit Pneumokokken-spezifischem Antiserum und grün- bzw. rot-fluoreszierenden Zweitantikörpern markiert. Immunfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen veranschaulichten die Menge der adhärenten und internalisierten Pneumokokken in HPMEC. Das Aktin-Zytoskelett der infizierten Zellen wurde mit grün-fluoreszierendem Phalloidin markiert.

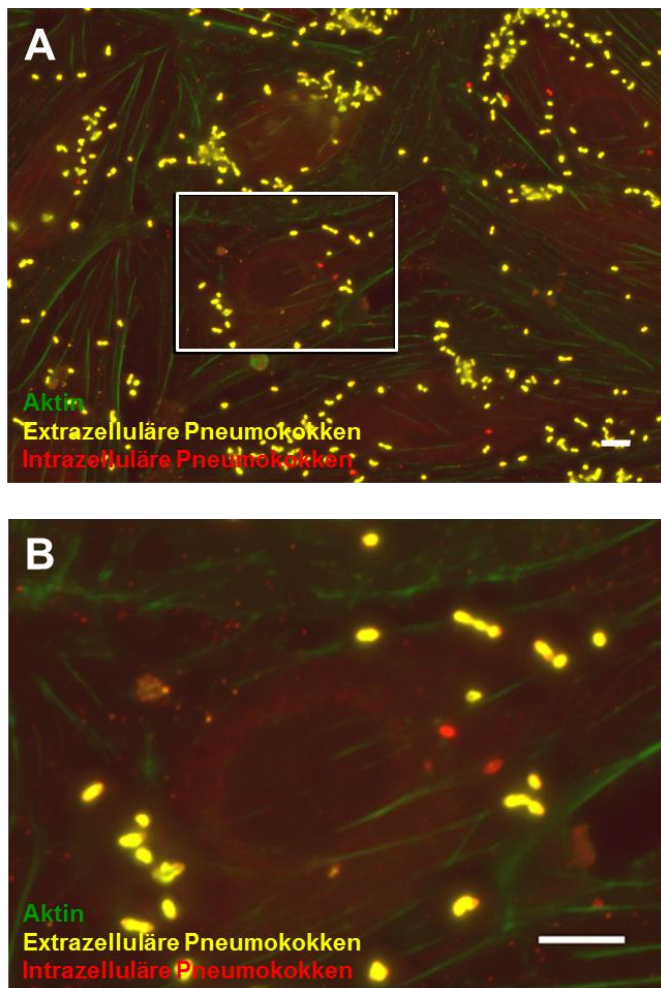


Abbildung 11: Fluoreszenzmikroskopische Visualisierung der Anzahl adhärenter und internalisierter Pneumokokken in HPMEC. Die Abbildungen zeigen die Menge der adhärenter (gelb) und internalisierten (rot) Pneumokokken in HPMEC in einer Übersicht (A), sowie in einem Ausschnitt (B). HPMEC wurden mit *S. pneumoniae* st35AΔply für 3,0 Std. + 1,5 Std. mit einer MOI von 50 infiziert. Die adhärenter und internalisierten Bakterien wurden mit spezifischen Pneumokokken-Antisera und fluoreszierenden Zweitantikörpern markiert und fluoreszenzmikroskopisch visualisiert. Zusätzlich wurde das Aktinzytoskelett der HPMEC mit grün-fluoreszierendem Phalloidin markiert (grün). Der Maßstab entspricht 10 µm.

Die mikroskopische Visualisierung der infizierten Zellen veranschaulichte die Menge der adhärenter und internalisierten Pneumokokken in HPMEC. Eine Schädigung der Zellstruktur durch die Infektion mit *S. pneumoniae* st35AΔply konnte bei einer Infektionszeit von 3,0 Std + 1,5 Std. mit einer MOI von 50 nicht beobachtet werden.

Die Ergebnisse der *in-vitro*-Infektionsstudien demonstrierten die Interaktion von Pneumokokken mit Lungenendothelzellen und Endothelzellen der Nabelschnur. Längere Infektionszeiten und größere Bakterienmengen führten zu stärkerer Adhärenz und Internalisierung. Um möglichst große Mengen an adhärierten und internalisierten Pneumokokken zu erzielen und gleichzeitig Zellschäden zu meiden, wurden die nachfolgenden Experimente standardisiert mit einer Infektionszeit von maximal 4,5 Std. und einer MOI von 50 durchgeführt.

4.3 Mikroarray-Analyse humaner Endothelzellen nach Infektion mit *S. pneumoniae*

In den vorangegangenen Experimenten wurde gezeigt, dass Pneumokokken mit humanen Lungenendothelzellen interagieren. Um Änderungen in der Genexpression von humanen Lungenendothelzellen als Reaktion auf Pneumokokkeninfektion zu untersuchen, wurden DNS-Mikroarray-Analysen durchgeführt. Nach der Infektion von HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply für 3,0 Std. + 1,5 Std. und einer MOI 50 wurde die RNS der Zellen isoliert. Anschließend wurde die RNS in cDNS umgeschrieben und diese mit HG U133 Plus 2.0 Genchips (Affymetrix) hybridisiert. Diese Mikroarray-Chips beinhalten Oligonukleotide, die 54.000 humane Gene repräsentieren. Die Detektion der Genprodukte erfolgte durch Inkubation der Chips mit Biotin-markierten Nukleotiden und Streptavidin-gekoppeltem Phycoerythrin. Nach der Fluoreszenzmarkierung der Nukleotide wurden die Signale der einzelnen Gene detektiert. Im Anschluss wurden die Signalintensitäten normalisiert. Dazu erfolgte eine Computer-basierte Filterung der Gene, deren Signalintensitäten mehr als dreifach so hoch waren und eine Signifikanz von $p < 0,05$ aufwiesen im Vergleich zu den Signalintensitäten von nicht-infizierten Zellen. Die normalisierten und gefilterten Signalintensitäten wurden in einem Dendrogramm dargestellt.

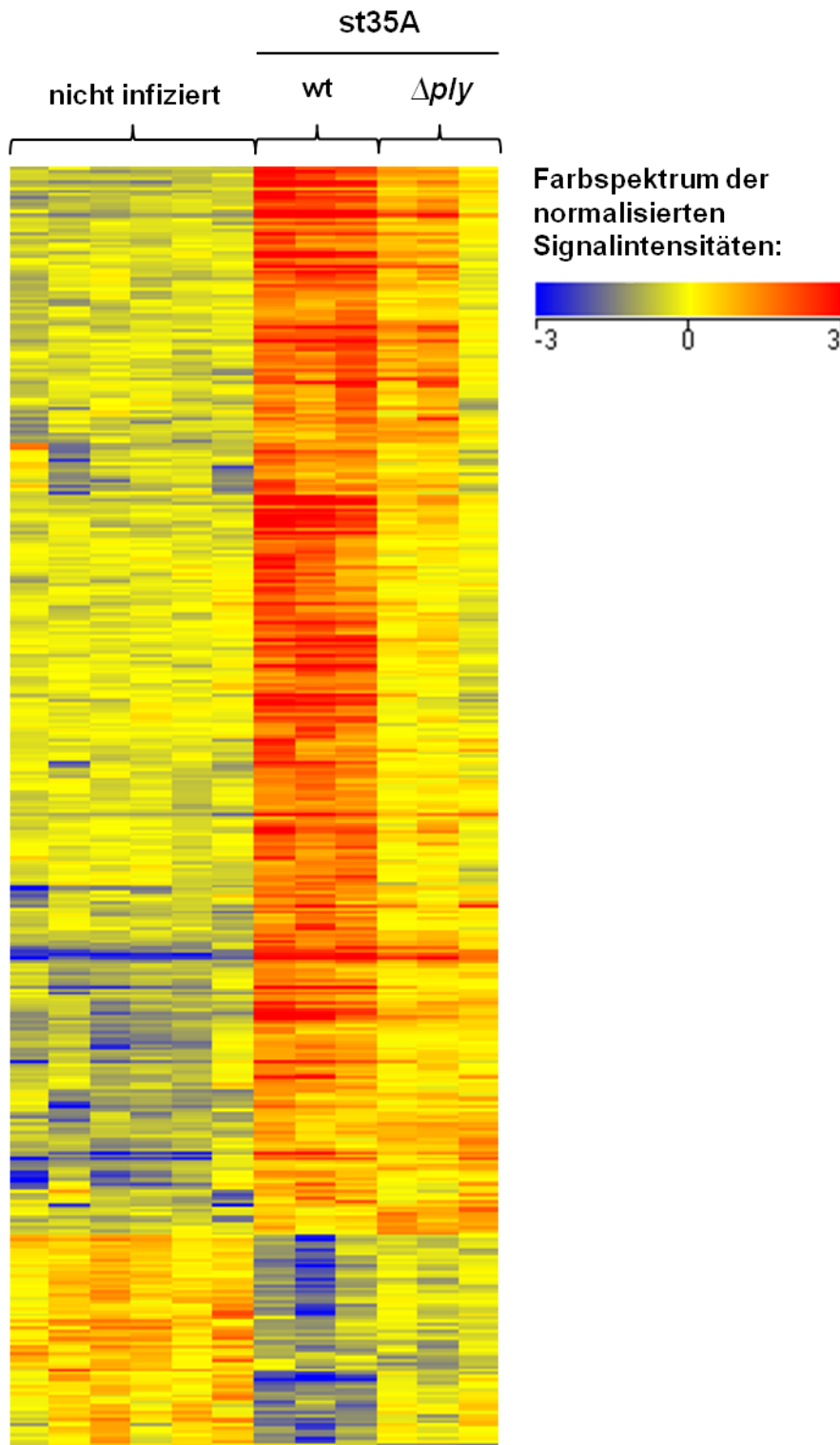


Abbildung 12: Dendrogramm der Mikroarray-Analyse von Pneumokokken-infizierten HPMEC im Vergleich zu nicht-infizierten HPMEC. Das Dendrogramm zeigt die Signalintensitäten von 396 Genen, die bei der Computer-basierten Auswertung selektioniert wurden. Dargestellt sind sechs unabhängige Analysen von nicht-infizierten Zellen und jeweils drei unabhängige Analysen von infizierten Zellen. In den Spalten des Dendrogramms sind die Signalintensitäten der einzelnen Analysegruppen dargestellt (nicht-infizierte HPMEC,

HPMEC, die mit *S. pneumoniae* st35A (st35A) und mit *S. pneumoniae* st35A Δ ply (st35A Δ ply) infiziert wurden). Die Zeilen des Dendrogramms repräsentierten die einzelnen Gene, wobei die Farbe einer Probe die normalisierte Signalintensität zeigt. Bei der normalisierten Signalintensität wurden die Signalintensitäten logarithmiert und von der Signalintensität jeder Probe der Median aus allen Proben eines Gens subtrahiert. Blau zeigt eine reduzierte Expression an, während rot für eine verstärkte Expression steht (siehe Farbspektrum).

Die Mikroarray-Analyse von nicht-infizierten HPMEC im Vergleich zu infizierten HPMEC ergab signifikante Unterschiede in den Signalintensitäten von 396 humanen Genen. Die Signalintensität eines Gens in einer Probe repräsentiert die Expression des Gens. Die Infektion von HPMEC mit dem Wildtyp-Stamm führte zur signifikanten Änderung in der Genexpression von 372 Genen. Von den 372 Genen der mit dem Wildtyp infizierten HPMEC wurden 312 Gene signifikant stärker exprimiert als in nicht-infizierten Zellen, während 60 Gene signifikant schwächer exprimiert wurden. Durch Infektion der HPMEC mit der Pneumolysin-defizienten Mutante änderte sich die Expression von 8 Genen, wovon 71 Gene signifikant stärker und 10 Gene signifikant schwächer exprimiert wurden als bei nicht-infizierten HPMEC. Bei den 396 Genen handelte es sich hauptsächlich um Gene der Immunantwort, z. B. Interleukin-8. Das Zytokin wurde nach der Infektion mit dem Wildtyp 6,6-fach und nach der Infektion mit der Mutante 5,6-fach stärker exprimiert als bei nicht-infizierten HPMEC.

4.4 Genexpressionsbestimmung von infizierten HPMEC im Vergleich zu nicht-infizierten HPMEC durch Real time PCR-Analyse

Zur Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse wurden Real time PCR-Analysen durchgeführt. Die Real time PCR ermöglicht eine quantitative Genexpressionsanalyse. Die Mikroarray-Analyse wies eine signifikant erhöhte Expression des *il-8*-Gens nach Infektion von HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply im Vergleich zu infizierten Zellen auf. Der Faktor der Genexpression (*fold change*) betrug 6,6 nach Infektion mit dem Wildtyp und 5,6 bei nach Infektion mit der Mutante. Zur Evaluierung des Mikroarray-Ergebnisses wurde die Real time-PCR-basierte Genexpressionsanalyse für das *il-8*-Gen durchgeführt. Nach der Infektion von HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply für 2,5 Std. und einer MOI 50 wurde die RNS der Zellen isoliert. Die RNS wurde in cDNS

umgeschrieben und in der Real time-PCR- eingesetzt. Die Genexpression aus drei unabhängigen Experimenten wurde mit der Genexpression von RPS9, einem *house keeping* Gen, verglichen.

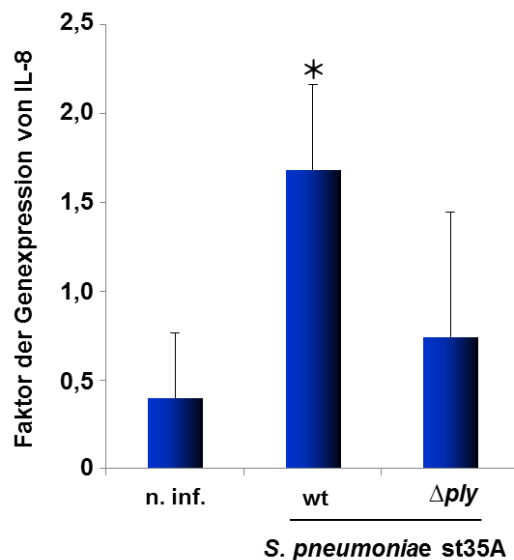


Abbildung 13: Expression des *il-8*-Gens in HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken.

Das Diagramm zeigt die Genexpression von *il-8* im Bezug zur Expression des *house-keeping*-Gens RPS9. Die Genexpressionsanalyse wurde von nicht-infizierten HPMEC und mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35AΔply-infizierten HPMEC durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte von drei Real time-PCR-Analysen. *) $p < 0,05$ (Signifikanz zu nicht-infizierten Zellen).

Die Genexpressionsanalyse des *il-8*-Gens zeigte eine signifikante Erhöhung der Genexpression nach Infektion der HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A. Der Faktor der Genexpression wurde in Relation zu RPS9 berechnet und betrug $1,69 \pm 0,48$ bei infizierten HPMEC, während der Faktor der Genexpression von *il-8* bei nicht-infizierten HPMEC $0,4 \pm 0,37$ betrug (Abb. 13). Durch die Infektion von *S. pneumoniae* st35AΔply konnte ebenfalls eine Erhöhung der Genexpression von *il-8* beobachtet werden. Der Faktor der Genexpression betrug $0,74 \pm 0,7$ (Abb. 13). Die Real time PCR-Analyse bestätigte das Ergebnis des Mikroarray. Die Infektion von HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35AΔply führte zu einer signifikanten Erhöhung der Genexpression von *il-8*.

4.5 WPB-Bildung in humanen Lungenendothelzellen unterschiedlicher Konfluenzen und Quantifizierung des Konfluenzstatus der Zellen

4.5.1 Korrelation der WPB-Bildung mit der Konfluenz des Endothels

In der Mikroarray-Analyse und der anschließenden Real time-PCR wurde gezeigt, dass HPMEC als Reaktion auf die Infektionen mit Pneumokokken Immunsystemkomponenten, wie z. B. Zytokine in stärkerem Maße exprimieren. Zytokine werden in Endothelzellen in besonderen Speicherorganellen, den WPBs gespeichert (Rondaij *et al.*, 2006). Die Konfluenz des Endothels und die damit verbundene WPB-Bildung wurde als ein wichtiger Parameter für den Differenzierungsstatus von Endothelzellen der Nabelschnur beschrieben (Howell *et al.*, 2004). Um die Konfluenzabhängige WPB-Bildung in HPMEC zu untersuchen, wurde der Anteil an WPB-positiven Zellen in HPMEC-Zellschichten nach Kultivierung bis zum Erreichen unterschiedlicher Konfluenzen bestimmt. Zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht wurden 3×10^5 Zellen ausgesät und kultiviert bis die Zellen im Zellverband eingebunden waren. Die Untersuchung der sub-konfluenten Zellschicht erfolgte durch Aussaat von 2×10^5 Zellen. Die Zellen wurden bis zur Ausbildung von lockeren Zellverbänden kultiviert. Für eine nicht-konfluente Zellschicht wurden 1×10^5 Zellen ausgesät. Das Aktin-Zytoskelett der Zellen wurde mit ALEXA 568-konjugiertem Phalloidin markiert. Die intrazellulär gebildeten WPBs wurden mit VWF-spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern markiert und der Anteil an WPB-positiven Zellen fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Hierbei wurden 200 Zellen pro Experiment bewertet und in Zellen mit WPBs oder Zellen ohne WPBs unterschieden und gezählt. Die Konfluenz der Zellschichten wurde durch Immunfluoreszenzfärbung des Aktin-Zytoskeletts mikroskopisch überprüft und visualisiert.

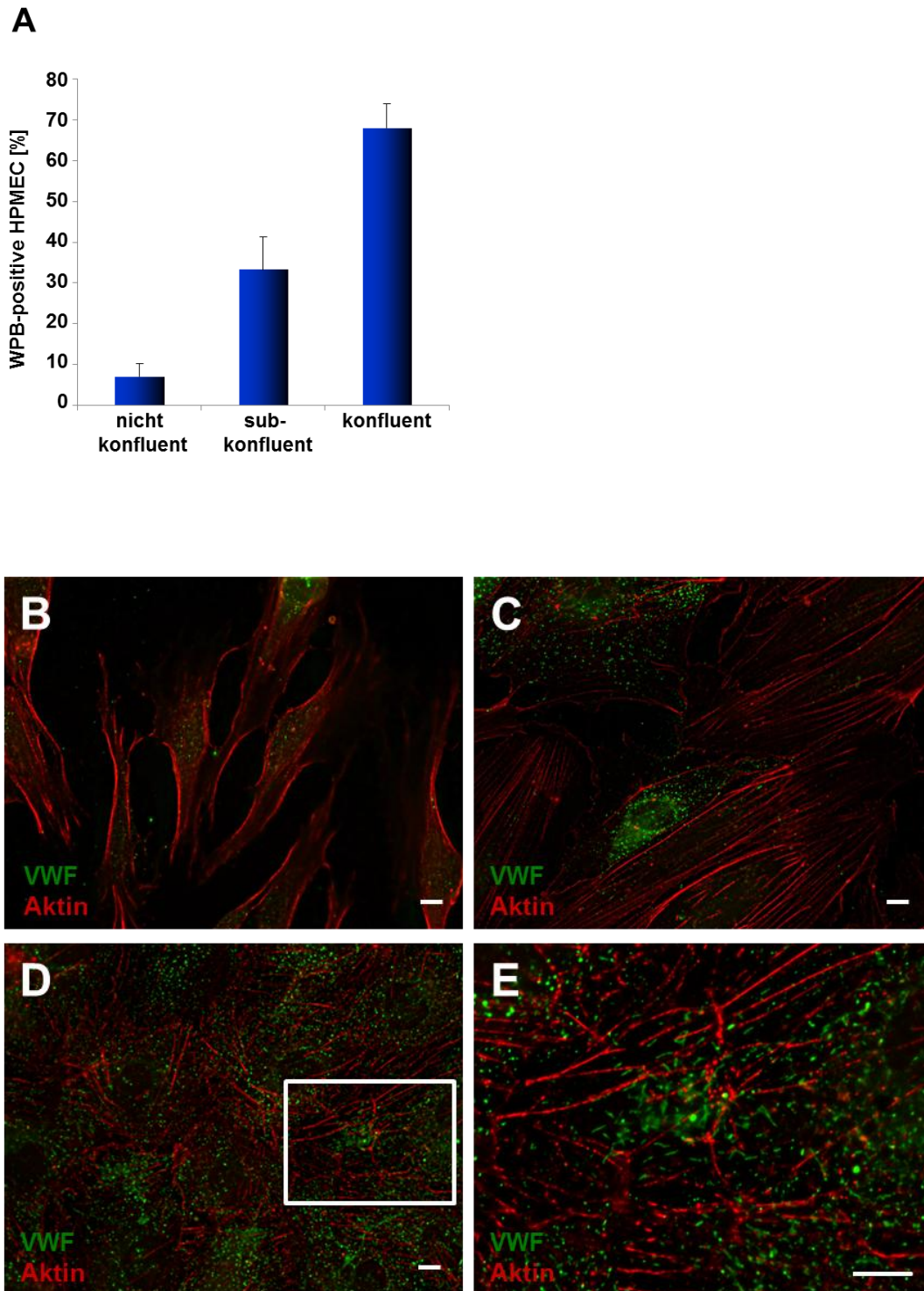


Abbildung 14: Mikroskopische Quantifizierung und Visualisierung von WPBs in HPMEC unterschiedlicher Zelldichten. A) Das Excel-Diagramm zeigt den Prozentanteil an WPB-positiven HPMEC in nicht konfluenten, sub-konfluenten und konfluenten *in-vitro*-Zellkulturen. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. **B-E)** Visualisierung der WPBs in nicht konfluenten (**B**) sub-konfluenten (**C**) und konfluenten (**D und E**) HPMEC-Schichten. Abbildung E ist ein Ausschnitt aus Abbildung D. Die Immunfluoreszenzfärbung der WPBs erfolgte mit VWF-

spezifischen Antikörpern und ALEXA-488-konjugierten Antikörpern. Das Aktin-Zytoskelett der Zellen wurde mit Phalloidin-ALEXA 568-konjugiert markiert. Die WPBs fluoreszieren grün und die Aktin-Fasern der Zellen rot. Der Maßstab entspricht in allen Abbildungen 10 μm .

In nicht konfluent-gewachsenen HPMEC lagen die Zellen einzeln und die Menge an WPB-positiven Zellen betrug nur $7,0 \% \pm 3,1 \%$ der bewerteten Zellen (Abb. 14 A und B). In semi-konfluent gewachsenen HPMEC enthielten $33,31 \% \pm 8,03 \%$ der gesamten Zellen WPBs (Abb. 14 A und C), während bei einer konfluenten HPMEC-Zellschicht $68,03 \% \pm 6,05 \%$ der quantifizierten Zellen WPB-positiv waren (Abb. 14 A, D und E). Diese Ergebnisse unterstützen die Studien von Howell und Kollegen und zeigen, dass die WPB-Bildung in Endothelzellen mit der Konfluenz der Endothelschicht korreliert.

4.5.2 Quantitative Bestimmung des Konfluenzstatus von HPMEC

Eine genaue Quantifizierung des Konfluenzstatus ist durch Verwendung eines cellZscope®-Messgerätes (NanoAnalytics, Deutschland) möglich, dass die biologische Impedanz durch Messung des transendothelialen Widerstandes (TER) und der elektrischen Kapazität (C_{cl}) bestimmt. Der elektrische Widerstand und die elektrische Kapazität sind geeignete Parameter um die Permeabilität von Zellschichten zu messen. Zur genauen Analyse der Konfluenz wurden HPMEC über mehrere Tage im Zweikammer-Transwell-System kultiviert und der elektrische Widerstand (TER) und die elektrische Kapazität (C_{cl}) mit dem cellZscope® (NanoAnalytics, Deutschland) gemessen und anschließend mit der cellZscope®-Software ausgewertet. Die Messung erfolgt transendothelial über zwei Elektroden, die über und unter der Zellschicht angebracht sind. In Abb. 14 A und B ist repräsentativ der Verlauf der Widerstands- und Kapazitätsmessungen während einer HPMEC-Kultivierung im Vergleich zum Zellkulturmedium dargestellt. Die Messungen erfolgten automatisiert jede Stunde für einen Zeitraum von 10 Tagen. Während der Kultivierung wurde zwischen zwei Einzelmessungen das Zellkulturmedium gewechselt (MW).

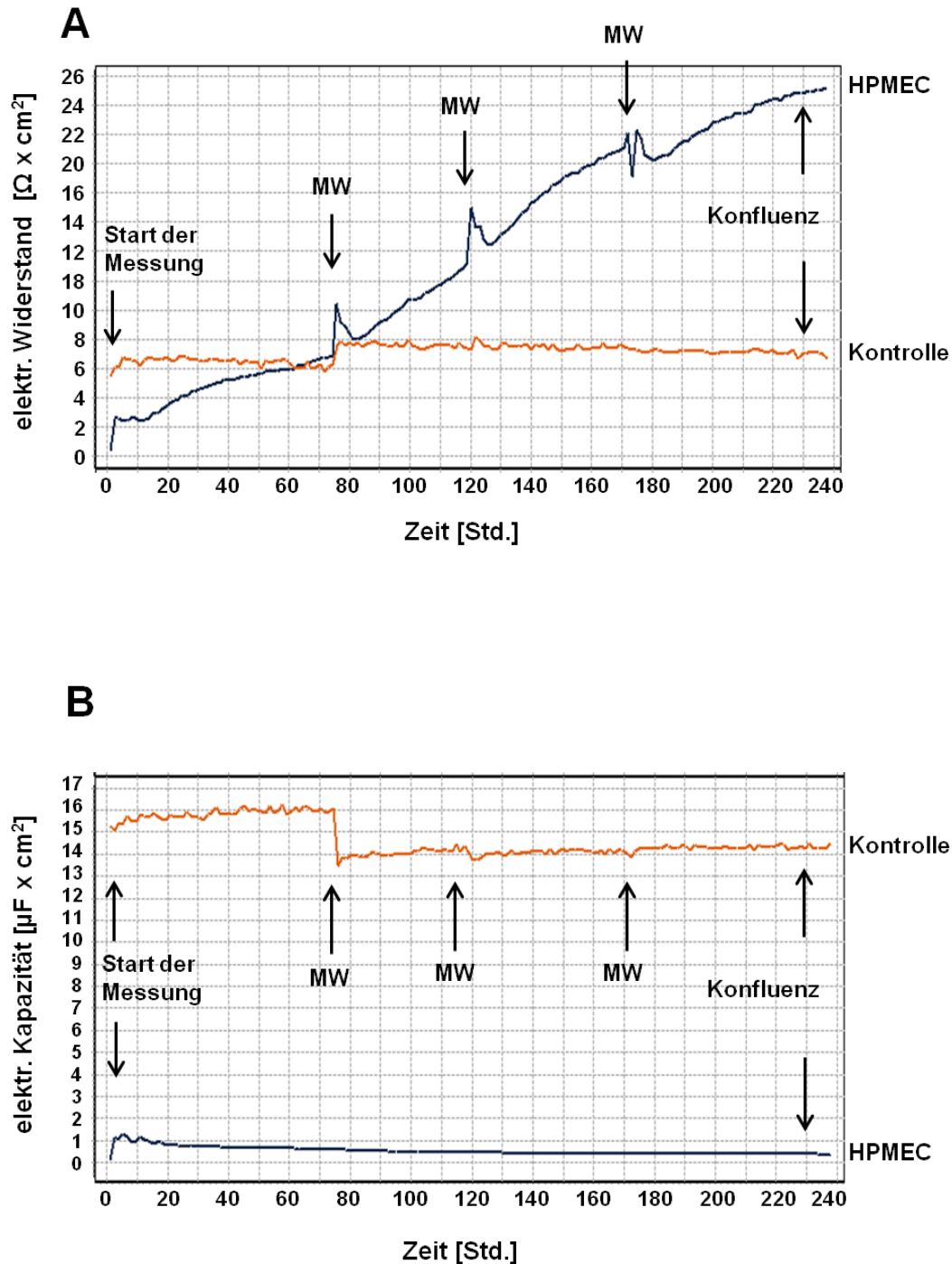


Abbildung 15: Messung des elektrischen Widerstandes und der Kapazität von HPMEC während der Kultivierung. HPMEC wurden im Zweikammer-Transwell-System im CellZscope-Modul für 240 Std. kontinuierlich bei 37 °C und 5 % CO₂ kultiviert und der elektrische Widerstand (**A**) und die elektrische Kapazität (**B**) der proliferierenden Zellschicht automatisiert in 1 Std.-Intervallen gemessen. Die Diagramme zeigen den Verlauf der Messungen mit HPMEC (schwarze Linie) und mit Zellkulturmedium (orange Linie). Während der Kultivierung wurde dreimal das Zellkulturmedium gewechselt (MW).

Im Verlauf der Kultivierung der HPMEC war ein Anstieg des transendothelialen Widerstandes zu beobachten. Beim zellfreien Zellkulturmedium erfolgte auch nach 240 Std. kein Anstieg des Widerstandes. Nach Kultivierungszeiträumen von 75 Std., 120 Std. und 175 Std. wurde das Zellkulturmedium gewechselt (siehe MW in Abb. 15 A und B). Nach 230 Std. erreichten die Widerstandswerte der HPMEC ein Plateau von $25 \Omega/\text{cm}^2 \pm 0,5 \Omega/\text{cm}^2$ (Abb. 15 A). Der elektrische Widerstand des Zellkulturmediums erreichte einen Maximalwert von $8 \Omega/\text{cm}^2 \pm 1 \Omega/\text{cm}^2$, der weitaus geringer war als der elektrische Widerstand der HPMEC (Abb. 15 A). Die Kapazitätswerte zeigten ebenfalls deutliche Unterschiede in der Messung der HPMEC zur Messung des Zellkulturmediums. Die elektrische Kapazität der HPMEC betrug $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2 \pm 0,12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$, während die zellfreie Kontrolle eine Kapazität von $14 \mu\text{F}/\text{cm}^2 \pm 0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2$ aufwies (Abb. 15 B).

4.6 Korrelation der Pneumokokkenadhärenz und der WPB-Menge in HPMEC

4.6.1 Adhärenz von *S. pneumoniae* an WPB-positive HPMEC und WPB-negative HPMEC

Zur Untersuchung der Adhärenz von Pneumokokken an WPB-positive oder WPB-negative Zellen, wurden *in-vitro*-Zellkulturinfektionen durchgeführt. Die Adhärenz von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply an WPB-positive oder WPB-negative HPMEC wurde im Zeitverlauf von 0,5 Std. bis 4,5 Std. fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und die adhärenenten Pneumokokken von jeweils 30 Zellen pro Zeitpunkt gezählt.

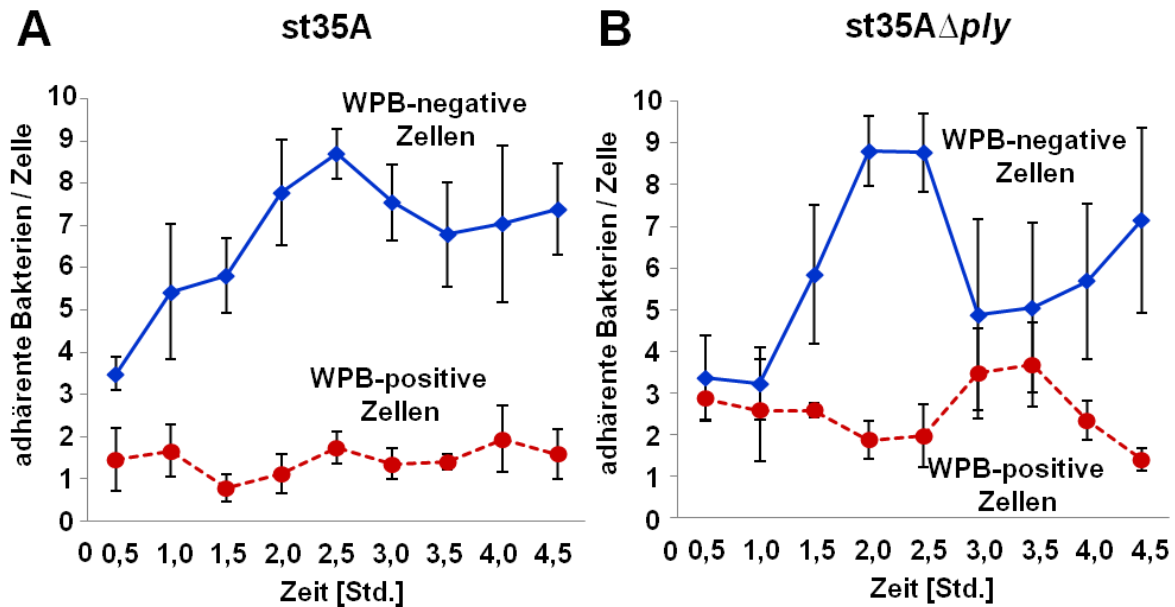


Abbildung 16: Adhärenz Pneumokokken an WPB-positiven und WPB-negativen Lungenendothelzellen. HPMEC wurden für 0,5 Std.; 1 Std.; 1,5 Std.; 2,0 Std.; 2,5 Std.; 3,0 Std.; 3,5 Std.; 4,0 Std. und 4,5 Std. mit Pneumokokken infiziert und anschließend mit Pneumokokken-spezifischen Antikörpern und fluoreszierenden Zweitantikörpern markiert. Die Detektion der WPBs erfolgte durch Markierung mit VWF-spezifischen Antikörpern aus der Maus und Maus-spezifischen ALEXA 488-konjugierten Zweitantikörpern. **A)** Infektion mit *S. pneumoniae* st35A und **B)** Infektion mit *S. pneumoniae* st35AΔply. Die Diagramme zeigen den Mittelwert und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten für jeden Zeitpunkt der Infektion.

Die Menge adherenter Pneumokokken an WPB-negativen HPMEC war bei beiden Bakterienstämmen größer als an WPB-positive HPMEC. Die Zahlen adherenter *S. pneumoniae* st35A an WPB-negative HPMEC stiegen im Infektionsverlauf zwischen 0,5 Std. bis 2,0 Std. an und betrugen 2,5 Std. nach Infektion 9 ± 1 Bakterien pro Zelle (Abb. 16 A). Die Pneumolysin-defiziente Mutante adhärte in vergleichbaren Mengen an WPB-negative HPMEC und erreichte 2,0 Std. nach Infektion maximale Zahl der adherenten Bakterien von 9 ± 1 Bakterien pro Zelle (Abb. 16 B). Nach einer Infektionsdauer von 3,0 Std. wurden die Mengen der adherenten Pneumokokken an WPB-negativen Zellen bei beiden Bakterienstämmen weniger. Die niedrigsten Anzahlen adherenter Bakterien an WPB-negativen Zellen nach mehr als 2,5 Std. der Infektion wurden beim Wildtyp 3,5 Std. nach Infektionsstart und bei der Mutante 3,0 Std. nach dem Infektionsstart quantifiziert. Die Mengen der adherenten Bakterien betragen 7 ± 1 Wildtyp-Bakterien nach Infektion von 3,5 Std. und 5 ± 2 Pneumolysin-defiziente Pneumokokken nach Infektion von 3,5 Std. (Abb. 16 A

und B). Die Zahl der adhärenenten Bakterien des Wildtyps und der Mutante an WPB-positive Endothelzellen stiegen zu jeden Infektionszeitpunkt nicht über 2 ± 1 Wildtyp-Pneumokokken pro Zelle bzw. 4 ± 1 Pneumolysin-defiziente Pneumokokken pro Zelle (Abb. 16 A und B).

4.6.2 Anteil WPB-positiver und WPB-negativer HPMEC im Infektionsverlauf mit Pneumokokken

Zur Bestimmung des Anteils WPB-positiver bzw. WPB-negativer Zellen im Verlauf einer Pneumokokkeninfektion wurden HPMEC im Zeitverlauf von 0,5 Std. bis 4,5 Std. mit Pneumokokken infiziert und der Anteil der WPB-positiven und WPB-negativen Zellen fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Zur Kontrolle wurde der Anteil der WPB-positiven und WPB-negativen HPMEC von nicht-infizierten Zellen bestimmt. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und jeweils 200 Zellen pro Zeitpunkt quantifiziert und die Mittelwerte berechnet. In Abb. 17 ist der Anteil der WPB-positiven Zellen an der Gesamtzellzahl für jeden Zeitpunkt dargestellt.

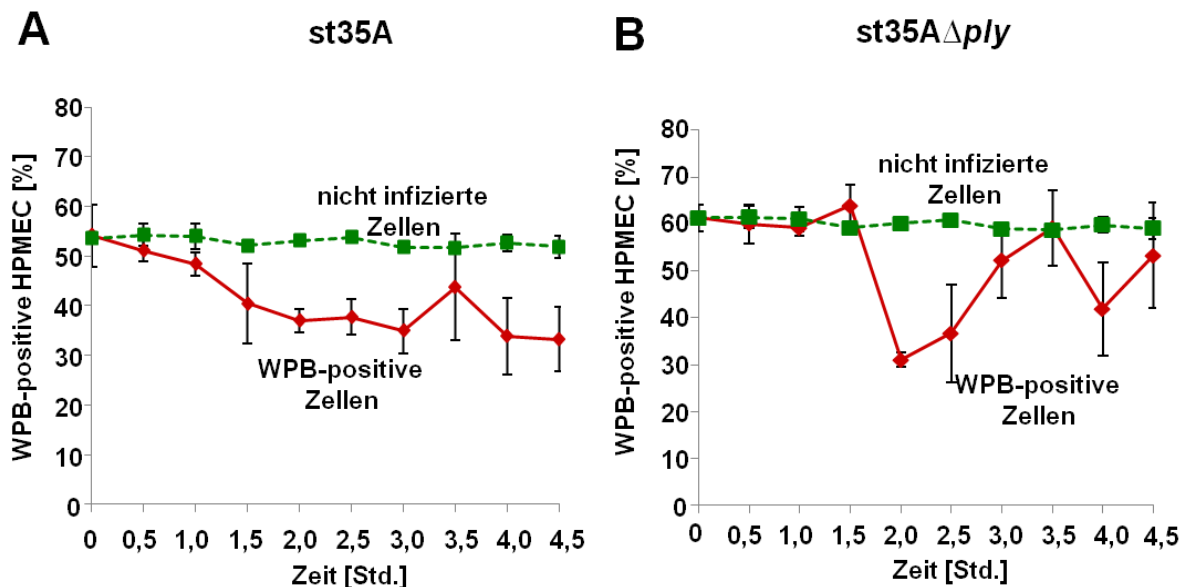


Abbildung 17: Quantifizierung von WPB-positiven HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken. Darstellung des Anteils der WPB-positiven Zellen für die Zeitpunkte der Infektion von 0,5 Std. bis 4,5 Std. (rote Linie) im Vergleich zum Anteil der WPB-positiven Zellen nicht-infizierter Zellen (grüne Linie). **A)** Anteil WPB-positiver HPMEC nach Infektion

mit *S. pneumoniae* st35A und **B**) nach Infektion mit *S. pneumoniae* st35A Δ ply. Die Detektion der WPBs erfolgte durch Immunfluoreszenzmarkierung von VWF. Die Standardabweichungen wurden aus drei unabhängigen Experimente berechnet.

Im Verlauf der Infektion mit *S. pneumoniae* st35A nahm der Anteil der WPB-positiven HPMEC in Relation zur Gesamtzellzahl von 54,14 % \pm 6,23 % auf 33,27 % \pm 6,54 % bis zur Infektionsdauer von 4,5 Std. ab (Abb. 17 A). Der prozentuale Anteil der WPB-positiven Zellen nahm im Infektionsverlauf mit der Pneumokokken-Mutante von 61,29 % \pm 2,78 % beim Infektionsstart auf 31,04 % \pm 1,58 % zwischen 1,5 Std. und 2,0 Std. nach Infektionsstart ab (Abb. 17 B). Zwischen 3,0 Std. und 3,5 Std. nach Infektionsstart stieg die prozentuale Menge der WPB-positiven Zellen im Bezug zur Gesamtzellzahl auf 43,77% \pm 10,66% beim Wildtyp und 58,8% \pm 9,98% bei der Mutante und sank nach 4,0 Std. wieder auf 33,84 % \pm 7,61 % beim Wildtyp und 41,87% \pm 9,98% bei der Mutante (Abb. 17 A und B). Nach 4,5 Std. Infektion mit dem Wildtyp war der prozentuale Anteil der WPB-positiven Zellen vergleichbar mit dem Wert nach 4,0 Std. und lag bei 33,27% \pm 6,54% (Abb. 17 A). Bei der Pneumolysin-defizienten Mutante stieg der Wert der WPB-positiven Zellen im Bezug zur Gesamtzellzahl wieder auf 53,33% \pm 11,24% an (Abb. 17 B).

4.6.3 Visualisierung der Menge adhärenter Pneumokokken und WPBs in infizierten Lungenendothelzellen

In fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden die adhärenenten Pneumokokken an HPMEC und die WPBs in den Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten der Infektion visualisiert. Die Lungenendothelzellen wurden mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply für 0,5 Std., 2,5 Std., 3,5 Std. und 4,5 Std. infiziert. Im Anschluss wurden die Pneumokokken mit Pneumokokken-spezifischen Antiseren und ALEXA-568-konjugierten Zweitantikörpern markiert. Die Immunfluoreszenzfärbung der WPBs erfolgte mit VWF-spezifischen primären Antikörpern und ALEXA 488-konjugierten Zweitantikörpern. Die Aufnahmen erfolgten am Fluoreszenzmikroskop Axio Observer Z1 (Zeiss) mit der Kamera AxioCamHRm (Zeiss) und die Software Axio Vision 4.7 (Zeiss). Die Abbildungen repräsentieren Z-Projektionen von mindestens 8 Einzelbildern, die mit einer jeweiligen Distanz von 300 nm aufgenommen wurden.

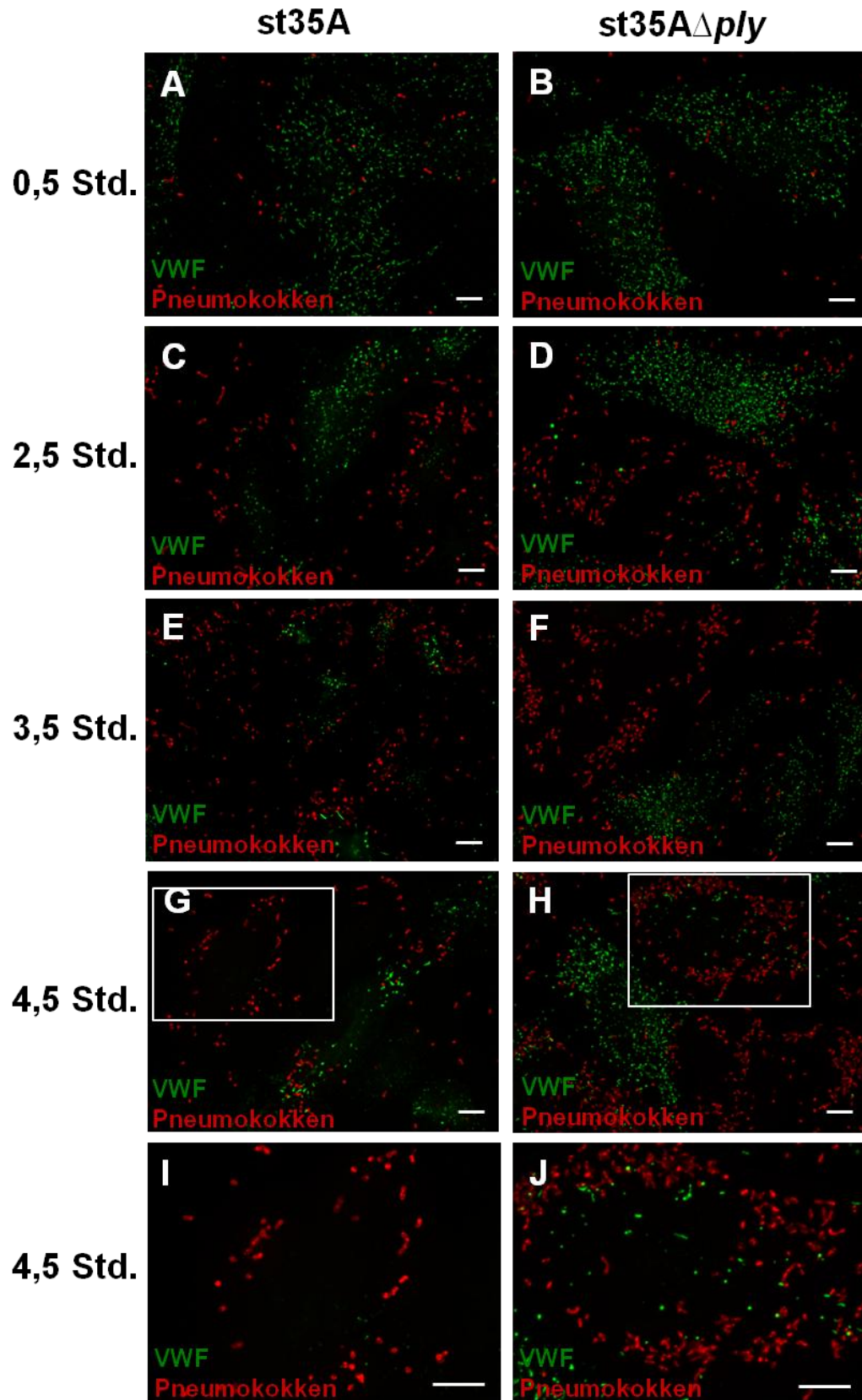


Abbildung 18: Visualisierung adhärenter Pneumokokken an HPMEC und WPBs in den Zellen zu verschiedenen Zeiten der Infektion. Die Abbildungen zeigen die Menge adhärenter *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply sowie die Menge der WPBs

in HPMEC zu unterschiedlichen Infektionszeitpunkten. HPMEC wurden für 0,5 Std. (**A** und **B**), 2,5 Std. (**C** und **D**), 3,5 Std. (**E** und **F**) und 4,5 Std. (**G** - **J**) mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply infiziert. Adhärenente Pneumokokken wurden mit Pneumokokken-spezifischen Antikörpern und ALEXA 568-konjugierten Zweitantikörpern detektiert und erscheinen rot, während WPBs mit VWF-spezifischen Antikörpern und ALEXA 488-konjugierten Zweitantikörpern detektiert wurden und grün erscheinen. Die Aufnahmen **I** und **J** sind Ausschnitte aus **G** und **H** (siehe Markierung). Der Maßstab entspricht 10 μ m.

In Abbildung 18 A-J wurden die Menge adhärenenter Pneumokokken im Verlauf der Infektion und die Anzahl an WPBs in der Zelle fluoreszenzmikroskopisch dargestellt. Die Menge der adhärenenten Wildtyp-Pneumokokken war nach Infektion von 0,5 Std. (Abb. 18 A und B), 2,5 Std. (Abb. 18 C und D) und 3,5 Std. (Abb. 18 E und F) vergleichbar mit der Menge der adhärenenten Pneumolysin-defizienten Pneumokokken nach den jeweiligen Infektionszeitpunkten. Längere Infektionszeiten führten bei beiden Stämmen zu höheren Zahl der adhärenenten Bakterien der Bakterien. Während des Infektionsverlaufes wurde der prozentuale Anteil an WPB-positiven Zellen weniger, während die Menge WPB-negativer Zellen zunahm (Abb. 18 G – J). Nach 4,5 Std. Infektion adhärenierten an den WPB-positiven HPMEC weniger Pneumokokken als an den WPB-negativen HPMEC.

4.7 Quantifizierung von VWF und IL-8 Im Zellkulturüberstand von infizierten Endothelzellen

Die Untersuchung zur Adhärenz von Pneumokokken an WPB-positive und -negative Zellen und die Untersuchung des Anteils von WPB-positiven Zellen nach Infektion mit Pneumokokken deuten darauf hin, dass die Pneumokokkenadhärenz die WPB-Exozytose aus HPMEC stimuliert. Um diese These näher zu untersuchen, wurden quantitative Analysen zur Detektion sekretierter WPB-Komponenten durchgeführt. WPBs enthalten das Zytokin IL-8 und VWF, ein multimeres Glykoprotein mit essentiellen Funktionen in der Hämostase (Fiedler *et al.*, 2004; Valentijn *et al.*, 2011; Rondaij *et al.*, 2006). Zur Bestimmung der VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von Pneumokokken-infizierten HPMEC wurden die Zellen im Zeitverlauf von 0,5 Std. bis 4,5 Std. mit dem Pneumokokken-Wildtyp und der Mutante infiziert und die VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand

durch ELISA-basierte Analysen quantifiziert. Zur Kontrolle wurden die VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten HPMEC bestimmt.

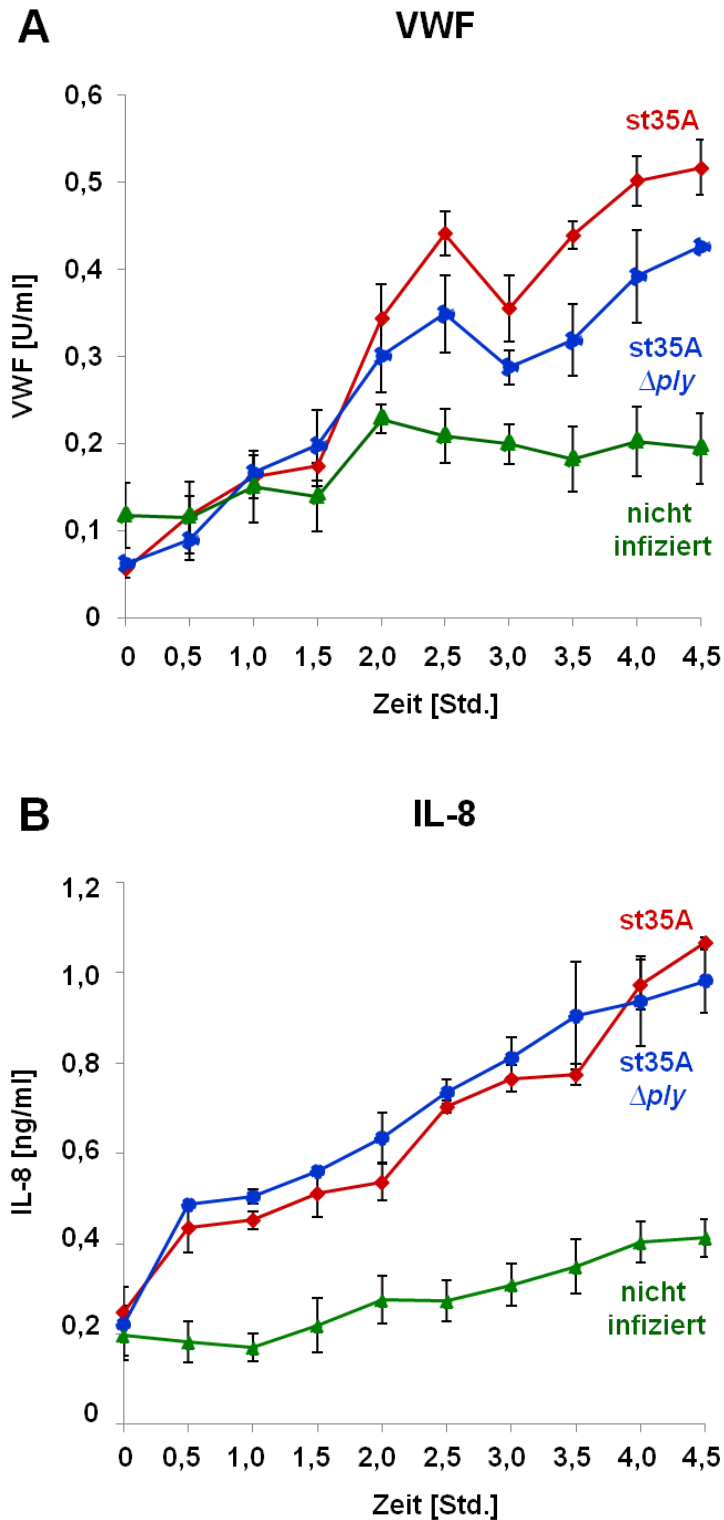


Abbildung 19: Quantitative Analyse sekretierter WPB-Bestandteile im Infektionsverlauf von HPMEC mit Pneumokokken. HPMEC wurden mit *S. pneumoniae* st35A (rote Linie)

und *S. pneumoniae* st35A Δ ply (blaue Linie) im Zeitverlauf von 0,5 Std. bis 4,5 Std. infiziert. Anschließend wurde die Konzentration von VWF (**A**) und IL-8 (**B**) im Zellkulturüberstand der infizierten Zellen in ELISA-basierten Analysen mit spezifischen Antikörpern quantifiziert. Die grüne Linie zeigt die VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten HPMEC. Die Quantifizierung der VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand erfolgte durch VWF-ELISA-Analysen. Die VWF-Konzentrationen wurden in U / ml bestimmt. Die IL-8-Konzentrationen wurde in ng/ml mit dem IL-8-ELISA Kit von Becton Dickinson bestimmt. Die Diagramme zeigen die Mittelwerte und die Standardabweichungen der Konzentrationen aus drei unabhängigen Analysen.

Die Ergebnisse der ELISA-Analysen zeigen den Anstieg der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand der Infektion von HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply (Abb. 19 A, rote und blaue Linie). Der erste Anstieg der VWF-Konzentration erfolgte nach 1,5 Std. Infektion von 0,06 U/ml \pm 0,01 U/ml beim Start der Infektion mit *S. pneumoniae* st35A auf 0,44 U/ml \pm 0,03 U/ml nach 2,5 Std. Infektion und von 0,06 U/ml \pm 0,01 U/ml beim Start der Infektion auf 0,35 U/ml \pm 0,04 U/ml nach 2,5 Std. Infektion mit *S. pneumoniae* st35A Δ ply (Abb. 19 A). Nach 3,0 Std. Infektion mit dem Wildtyp und der Pneumolysinmutante war die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand geringer als 0,5 Std. zuvor und betrug 0,35 U/ml \pm 0,04 U/ml beim Wildtyp und 0,29 U/ml \pm 0,02 U/ml bei der Mutante (Abb. 19 A, st35A und st35A Δ ply). Im weiteren Verlauf der Infektion stieg die Menge an VWF auf ein Maximum von 0,52 U/ml \pm 0,03 U/ml nach 4,5 Std. Infektion mit dem Wildtyp und 0,43 U/ml \pm 0,01 U/ml nach 4,5 Std. Infektion mit der Mutante (Abb. 19 A). Die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten HPMEC stieg von 0,12 U/ml \pm 0,03 U/ml beim Inkubationsstart auf 0,23 U/ml \pm 0,02 U/ml nach 2,0 Std. Inkubation an, verlief dann konstant bis zu einem Wert von 0,19 U/ml \pm 0,04 U/ml nach 4,5 Std. (Abb. 19 A, grüne Linie). Die Konzentration des VWF in infizierten HPMEC war ab einer Infektionsdauer von 2,0 Std. bis zu 4,5 Std. signifikant höher als in nicht-infizierten Zellen (Abb. 19 A). Des Weiteren führte die Infektion von HPMEC mit Pneumokokken zu einem Anstieg der IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand (Abb. 19 B, rote und blaue Linie). Die IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand betrug beim Infektionsstart 0,25 ng/ml \pm 0,01 ng/ml beim Wildtyp und 0,22 ng/ml \pm 0,08 ng/ml bei der Pneumolysin-defizienten Mutante (Abb. 19 B). Nach 4,5 Std. der Infektion mit *S. pneumoniae* st35A betrug die IL-8-Konzentration 1,07 ng/ml \pm 0,01 ng/ml und erreichte 4,5 Std. nach der Infektion mit *S. pneumoniae* st35A Δ ply eine vergleichbare Konzentration von 0,98 ng/ml \pm 0,003 ng/ml (Abb. 19 B). Die IL-8-Konzentration der nicht-infizierten HPMEC zeigte einen leichten Anstieg von 0,2 ng/ml \pm 0,05 ng/ml beim Start der Inkubation auf 0,41 ng/ml \pm 0,002 ng/ml

nach 4,5 Std. (Abb. 19 B, grüne Linie). Die IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand der infizierten HPMEC war über die gesamte Infektionsdauer von 0,5 Std. bis 4,5 Std. signifikant höher als die IL-8-Konzentration der nicht-infizierten HPMEC (Abb. 19 B). Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Adhärenz von Pneumokokken die WPB-Exozytose von HPMEC induziert.

4.8 VWF-Sekretion durch Pneumokokkenmembranproteine

Viele Oberflächenfaktoren von *S. pneumoniae* sind an Wirt-Pathogen-Interaktionen beteiligt (Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Um die Funktion der Pneumokokkenmembranproteine in der Adhärenz-vermittelten WPB-Exozytose zu untersuchen, wurden die Membranproteine von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply präpariert und für 2,5 Std. mit HPMEC inkubiert. Die Zellen wurden mit 4,0 μ g/ml Membranproteinen inkubiert. Diese Menge entspricht der Oberflächenproteinmenge von 1×10^7 Bakterien, mit denen die Zellen in Zellkulturinfektionsexperimenten infiziert wurden. Des Weiteren wurden HPMEC mit 4,0 μ g/ml einer Lipopolysaccharidpräparation (LPS) von *Salmonella typhimurium* und 4,0 μ g/ml einer Lipoteichonsäurepräparation (LTA) von *Staphylococcus aureus* inkubiert. Anschließend wurden die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand quantifiziert. Als Kontrolle erfolgte die Bestimmung der VWF-Menge im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten HPMEC.

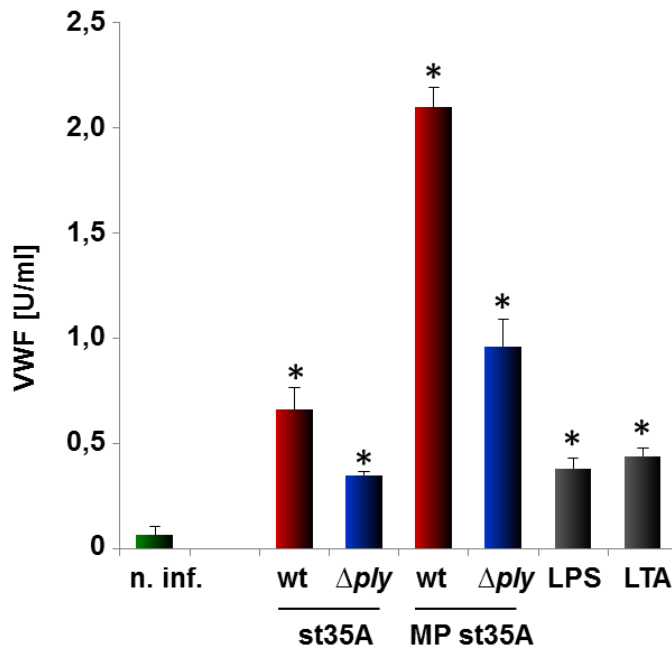


Abbildung 20: Quantifizierung der VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation von HPMEC mit Membranproteinen, LPS und LTA. HPMEC wurden mit 4,0 µg/ml einer Membranproteinpräparation des Pneumokokken-Serotyps 35A (MP st35Awt) bzw. der Pneumolysin-defizienten Mutante (MP st35A Δply), LPS oder LTA für 2,5 Std. inkubiert. Parallel wurden HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A (st35A) und *S. pneumoniae* st35A Δply (st35A Δply) für 2,5 Std. infiziert. Die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden durch ELISA-Analysen mit VWF-spezifischen Antikörpern quantifiziert. Die Konzentrationsbestimmung von VWF im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen diente als Kontrolle. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus drei unabhängigen Experimenten. *) Statistische Signifikanz der VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der infizierten und inkubierten HPMEC gegenüber der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen ($p < 0,05$).

Die Inkubation von HPMEC mit Pneumokokkenmembranproteinen führte zu signifikant höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand im Vergleich zu infizierten und nicht-infizierten Zellen (Abb. 20). Im Zellkulturüberstand von HPMEC, die mit *S. pneumoniae* st35A infiziert waren, wurden 0,66 U/ml \pm 0,1 U/ml VWF quantifiziert (Abb. 20). Bei der Mutante betrug die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand 0,35 U/ml \pm 0,01 U/ml VWF (Abb. 20). Die Bestimmung der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Pneumokokkenmembranproteinen des Wildtyps ergab die dreifache Menge VWF im Zellkulturüberstand als bei HPMEC nach Infektion mit dem Wildtyp. Die Konzentration des VWF nach Inkubation der Zellen mit Wildtyp-Membranproteinen betrug 2,10 U/ml \pm 0,09 U/ml

(Abb. 20). Die Quantifizierung der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC, die mit Membranproteinen der Mutante inkubiert waren, ergab eine mehr als zweifache Konzentration von $0,96 \text{ U/ml} \pm 0,13 \text{ U/ml}$ VWF als nach Infektion mit der Mutante (Abb. 20). Im Gegensatz zu den hohen Werten der VWF-Menge durch die Pneumokokkenmembranproteine, ist die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit LPS und LTA geringer. Die VWF-Konzentration betrug nach Inkubation mit LPS $0,38 \text{ U/ml} \pm 0,05 \text{ U/ml}$ VWF und nach Inkubation mit LTA $0,44 \text{ U/ml} \pm 0,04 \text{ U/ml}$ VWF (Abb. 20). Die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit LPS oder LTA waren im Vergleich zu der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen signifikant höher ($p < 0,05$).

4.9 Induktion der WPB-Exozytose durch Hitze-inaktivierte Pneumokokken

Um den Einfluss der Adhärenz von Pneumokokken auf die WPB-Exozytose detaillierter zu analysieren, wurden Lungenendothelzellen mit Hitze-inaktivierten Pneumokokken inkubiert. Durch die Hitze-Inaktivierung wurden die Bakterien abgetötet. Nach 2,5 Std. Inkubation der HPMEC mit Hitze-inaktivierten Pneumokokken wurde der Anteil der WPB-positiven Zellen im Bezug zur Gesamtzellzahl fluoreszenzmikroskopisch quantifiziert. Als Kontrolle wurde der Anteil der WPB-positiven Zellen in infizierten HPMEC und in nicht-infizierten HPMEC fluoreszenzmikroskopisch bestimmt. Dazu wurden die Zellen mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply für 2,5 Std. infiziert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und je Experiment 200 Zellen ausgezählt. Zur Kontrolle der vollständigen Hitze-Inaktivierung der Pneumokokken erfolgte eine Kultivierung auf Festmedium.

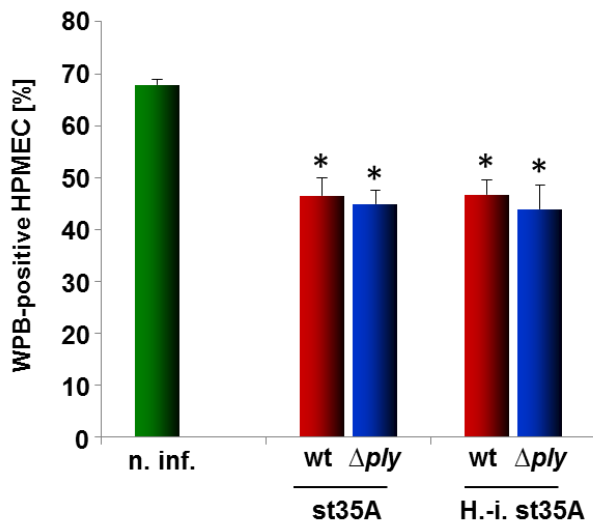


Abbildung 21: Anteil der WPB-positiven HPMEC nach Inkubation mit Hitze-inaktivierten Pneumokokken. Das Diagramm zeigt den prozentualen Anteil der WPB-positiven HPMEC im Bezug zur Gesamtzellzahl nach einer Infektion mit Hitze-inaktivierten Pneumokokken (H.-i. st35A). Zum Vergleich wurden die WPB-positiven HPMEC im Bezug zur Gesamtzellzahl nach Infektion mit lebenden Pneumokokken (st35A) und bei nicht-infizierten HPMEC (n. inf.) quantifiziert. Die Quantifizierung erfolgte nach Immunfluoreszenzfärbung und fluoreszenzmikroskopischer Auswertung. Die Standardabweichung wurde aus den Werten von drei unabhängigen Experimenten berechnet. *) Signifikanz der Unterschiede im prozentualen Anteil an WPB-positiven infizierten Zellen zum Anteil von WPB-positiven nicht-infizierten Zellen ($p < 0,05$).

Die Inkubation von HPMEC mit Hitze-inaktivierten Pneumokokken führte zu einem geringeren prozentualen Anteil der WPB-positiven HPMEC im Bezug zur Gesamtzellzahl. Der Anteil der WPB-positiven HPMEC im Bezug zur Gesamtzellzahl betrug nach Inkubation mit Hitze-inaktivierten Pneumokokken $46,67 \% \pm 2,82 \%$ für *S. pneumoniae* st35A und $43,94 \% \pm 4,55 \%$ für *S. pneumoniae* st35A Δply und gleicht dem prozentualen Anteil der WPB-positiven HPMEC nach Infektion mit lebenden Pneumokokken mit $46,56 \% \pm 3,33 \%$ für den Wildtyp und $44,98 \% \pm 2,57 \%$ für die Mutante (Abb. 21). Im Gegensatz dazu war der Anteil der WPB-positiven HPMEC in nicht-infizierten Zellen mit $67,95 \% \pm 0,97 \%$ signifikant höher (Abb. 21). Diese Ergebnisse zeigen, dass sowohl die Infektion mit lebenden als auch mit abgetöteten Pneumokokken den prozentualen Anteil an WPB-positiven HPMEC reduziert.

4.10 Stimulierung der VWF-Sekretion durch bekapselte Serotyp 2 Pneumokokken

Zur Untersuchung der Induktion der WPB-Exozytose durch stark bekapselte Pneumokokken-Serotypen wurden HPMEC mit *S. pneumoniae* D39 infiziert. *S. pneumoniae* D39 ist ein stark bekapseltes und stark virulentes Serotyp 2-Isolat. Um die Funktion der Polysaccharidkapsel der Pneumokokken und den Einfluss der Sekretion von Pneumolysin festzustellen, wurden *in-vitro*-Infektionsexperimente mit Kapsel- und Pneumolysinmutanten des Serotyp 2 durchgeführt. Die Zellen wurden für 2,5 Std. mit dem Wildtyp, einer Pneumolysinmutante, einer Kapselmutante und einer Doppelmutante für das Pneumolysingen und den Kapselgenkomplex infiziert. Bei der Pneumolysinmutante erfolgte die Deletion des Pneumolysingens. Dadurch exprimieren die Pneumokokken kein Pneumolysin. Bei der Kapselmutante wurden die Gene des Kapselgenlocus deletiert. Diese Bakterien können keine Kapsel synthetisieren. Die Doppelmutante kann weder Pneumolysin exprimieren, noch eine Kapsel bilden. Nach der Infektion der Zellen wurden die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand quantifiziert.

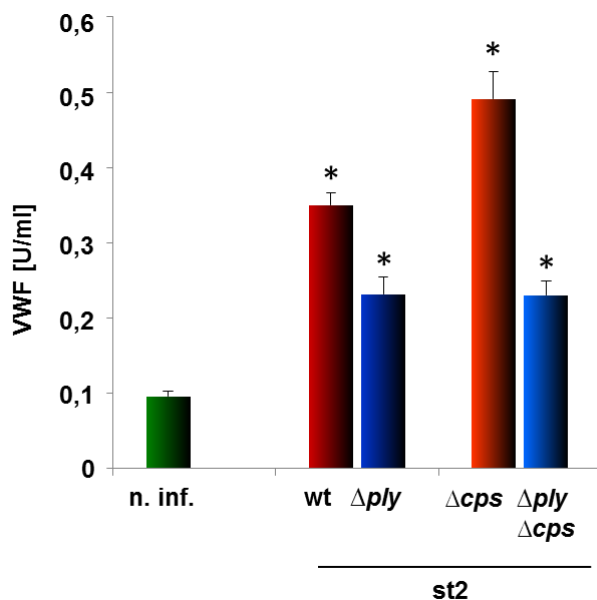


Abbildung 22: VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Infektion mit *S. pneumoniae* st2 und Kapsel- bzw. Pneumolysinmutanten des Serotyp 2. HPMEC wurden mit dem Wildtyp (wt), einer Pneumolysin-Mutante (Δply), einer Kapselmutante (Δcps) und einer Doppelmutante ($\Delta ply \Delta cps$) für 2,5 Std. infiziert und die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand in ELISA-Analysen quantifiziert. Zur Kontrolle wurde die VWF-

Konzentration im Überstand nicht-infizierter HPMEC untersucht. *) Signifikanz der Unterschiede der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand infizierter Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen ($p < 0,05$).

Die Infektion von HPMEC mit dem Serotyp 2 und den Mutanten des Serotyp 2 resultierte wie bei dem Serotyp 35A in einer Sekretion von VWF in den Zellkulturüberstand. Die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand betrug nach Infektion mit dem Wildtyp $0,35 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ und war signifikant höher als die Konzentration bei nicht-infizierten Zellen (Abb. 22). Nach Infektion mit der Kapselmutante des Serotyp 2 ($\text{st2}\Delta\text{cps}$), die keine Kapselpolysaccharide synthetisiert, wurden deutlich höhere VWF-Konzentrationen von $0,49 \text{ U/ml} \pm 0,04 \text{ U/ml}$ als nach Infektion mit dem stark bekapselten Wildtyp quantifiziert (Abb. 22). Im Gegensatz dazu war die VWF-Konzentration von $0,23 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ nach Infektion mit der Pneumolysin-defizienten Mutante ($\text{st2}\Delta\text{ply}$) geringer als die VWF-Konzentration nach Infektion mit dem Wildtyp (Abb. 22). Die Doppelmutante ($\text{st2}\Delta\text{ply}\Delta\text{cps}$) induzierte die VWF-Sekretion in vergleichbaren Konzentrationen wie die Pneumolysin-defiziente Mutante. Die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Infektion mit der Doppelmutante betrug $0,23 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ (Abb. 22). Die Konzentration des VWF im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen betrug $0,08 \text{ U/ml} \pm 0,01 \text{ U/ml}$ und war signifikant geringer als die Konzentrationen des VWF im Zellkulturüberstand der infizierten Zellen (Abb. 22). Die Ergebnisse der Analyse demonstrieren, dass die Sekretion von VWF aus Lungenendothelzellen durch den stark bekapselten Serotyp 2 induziert wird. Die Infektion mit Bakterien, die keine Polysaccharidkapsel synthetisieren, führte zu höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand als die Infektion der Zellen mit dem Wildtyp. Darüber hinaus bestätigen die Ergebnisse mit der Pneumolysin-defizienten Mutante und der Doppelmutante, dass Pneumolysin die Sekretion von VWF aus HPMEC stimuliert.

4.11 Stimulierung der VWF-Sekretion durch andere Bakterienstämme

In den bisherigen Experimenten wurde die Stimulierung der VWF-Sekretion durch Pneumokokken gezeigt. Zur Untersuchung der Stimulierung der VWF-Sekretion von Lungenendothelzellen durch verschiedene Bakterienstämme, wurden HPMEC mit *Escherichia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* PA1, *Neisseria meningitidis* N4,

Staphylococcus aureus st3, *Streptococcus canis* G361 und *Streptococcus pyogenes* S33 für 2,5 Std. infiziert. Zum Vergleich mit Pneumokokken wurden die HPMEC parallel mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply infiziert. Die Infektion erfolgte bei den Pneumokokken, *E. coli*, *P. aeruginosa*, *N. meningitidis* und *S. aureus* mit einer MOI 50. Um eine Schädigung der HPMEC durch zu hohe Bakterienmengen zu mindern, erfolgte die Infektion mit *S. canis* und *S. pyogenes* mit einer MOI 5.

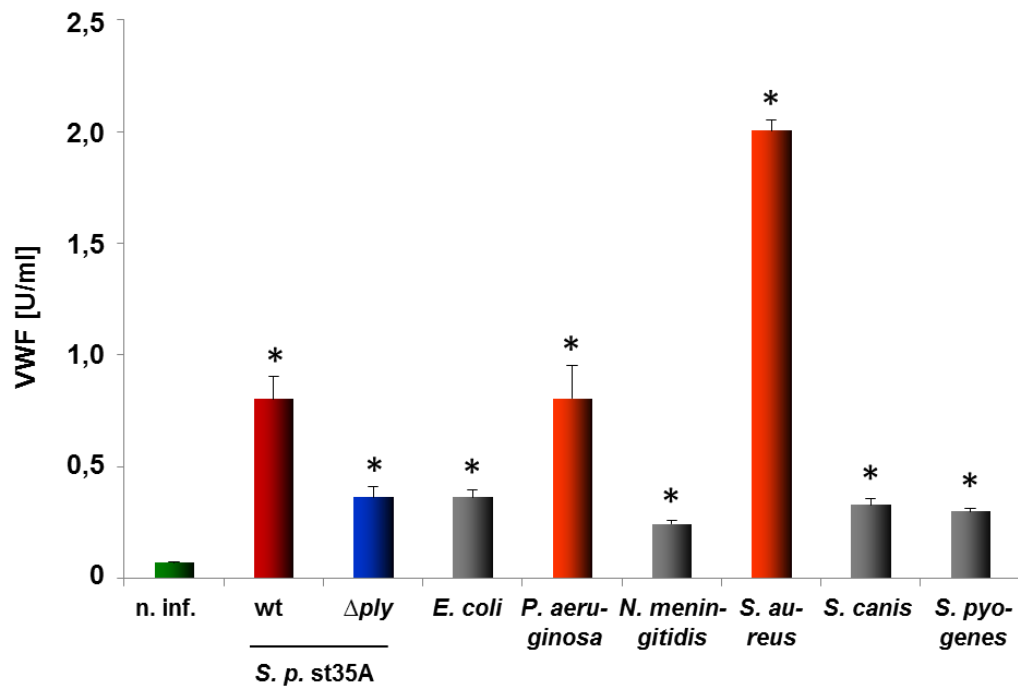


Abbildung 23: Quantifizierung der VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Infektion von HPMEC mit verschiedenen Bakterienstämmen. HPMEC wurden mit *S. pneumoniae* st35A (st35Awt), *S. pneumoniae* st35A Δ ply (st35A Δ ply), *Escherichia coli* DH5 α , *Pseudomonas aeruginosa* PA1, *Neisseria meningitidis* N4, *Staphylococcus aureus* st3, *Streptococcus canis* G361 und *Streptococcus pyogenes* S33 für 2,5 Std. infiziert. Anschließend wurden die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand durch ELISA-Analysen bestimmt. Als Kontrolle wurde die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten HPMEC quantifiziert. Das Diagramm zeigt die Mittelwerte und Standardabweichungen von drei unabhängigen Experimenten. *) Signifikanz der Unterschiede zwischen der VWF-Konzentration der infizierten Zellen und der VWF-Konzentration von nicht-infizierten Zellen ($p < 0,05$).

Die Infektion von HPMEC mit verschiedenen Bakterienstämmen führte bei jedem Bakterienstamm zu einer signifikant höheren VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zur VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen (Abb. 23). Die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der Bakterienstämme waren sehr unterschiedlich. Die höchste VWF-Konzentration von $2,0 \text{ U/ml} \pm 0,05 \text{ U/ml}$ induzierte *S. aureus* st3, die niedrigste Konzentration von $0,24 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ VWF induzierte *N. meningitidis* N4 (Abb. 23). Die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Infektion mit *S. aureus* st3 ist doppelt so hoch wie die VWF-Konzentration nach der Infektion mit dem Pneumokokken-Wildtyp. Die Infektion mit *S. pneumoniae* st35A stimulierte die HPMEC zur Sekretion von $0,8 \text{ U/ml} \pm 0,1 \text{ U/ml}$ VWF (Abb. 23). Diese Konzentration ist vergleichbar mit der VWF-Konzentration von $0,8 \text{ U/ml} \pm 0,15 \text{ U/ml}$ nach Infektion mit *P. aeruginosa* (Abb. 23). Die Infektion mit der Pneumokokken-Mutante führte zu einer Konzentration von $0,36 \text{ U/ml} \pm 0,05 \text{ U/ml}$ VWF im Zellkulturüberstand und war vergleichbar mit den Konzentrationen nach Infektion mit *E. coli* DH5 α , *S. canis* G361 und *S. pyogenes* S33. Die VWF-Konzentration nach Infektion mit *E. coli* DH5 α betrug $0,36 \text{ U/ml} \pm 0,03 \text{ U/ml}$, nach Infektion mit *S. canis* G361 $0,33 \text{ U/ml} \pm 0,03 \text{ U/ml}$ und nach Infektion mit *S. pyogenes* S33 $0,3 \text{ U/ml} \pm 0,01 \text{ U/ml}$ (Abb. 23).

4.12 Stimulierung der VWF-Sekretion durch sekretierte Pneumokokkenproteine

In den vorangegangenen Versuchen wurde hauptsächlich der Einfluss der Pneumokokken und ihrer Zellwandproteine auf die Sekretion von VWF aus Endothelzellen untersucht. Um den Einfluss von sekretierten Pneumokokkenfaktoren auf die VWF-Sekretion zu untersuchen, wurde ein Zweikammer-Transwell-System benutzt. HPMEC wurden auf dem Boden des Zweikammer-Transwell-Systems bis zum Erreichen einer konfluenten Zellschicht kultiviert. Im Verlauf der Infektion mit dem Serotyp 35A und dem Serotyp 35A Δ ply wurden die Pneumokokken durch eine semipermeable Membran von den HPMEC getrennt. Der Porendurchmesser der Membranporen betrug $0,4 \mu\text{m}$ und war für eine Pneumokokkentransmigration undurchlässig. Nach einer Inkubationszeit von 2,5 Std. wurde die VWF-Konzentration in dem Zellkulturmedium der unteren Kammer quantifiziert. Als Kontrolle wurden HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply in einer MOI 50 für 2,5 Std. ohne Trennung durch eine Membran infiziert.

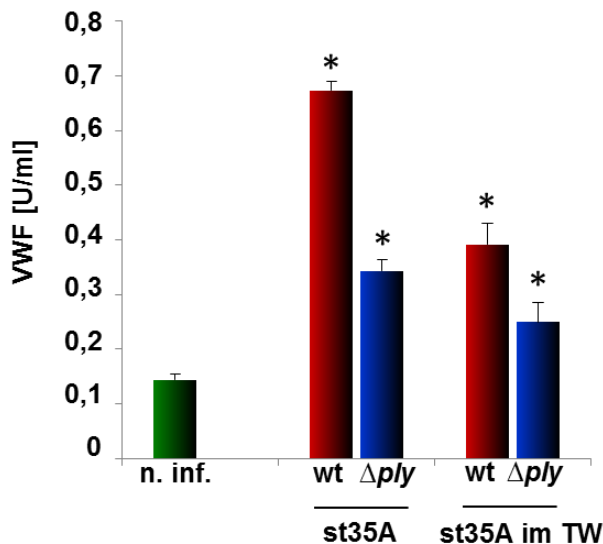


Abbildung 24: VWF-Konzentration im Zellkulturmedium nach Stimulierung von HPMEC durch sekretierte Pneumokokkenfaktoren. HPMEC wurden auf dem Boden eines Zweikammer-Transwell-Systems kultiviert und mit dem Pneumokokken-Wildtyp (st35Awt im TW) und der Mutante (st35A Δply im TW) in der oberen Kammer des Systems für 2,5 Std. inkubiert. Die Bakterien in diesem System waren durch eine semipermeable Membran von den Zellen getrennt. Zum Vergleich wurden HPMEC mit dem Serotyp 35A (wt) und dem Serotyp 35A Δply (Δply) im Standardinfektionsversuch infiziert. Die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wurden durch ELISA-Analysen mit spezifischen Antikörpern quantifiziert. Als Kontrolle wurde die VWF-Konzentration im Zellkulturmedium nicht-infizierter HPMEC bestimmt (n. inf.). Der Versuch wurde dreimal unabhängig voneinander durchgeführt und die jeweiligen Mittelwerte sind in dem Diagramm dargestellt. *) Signifikanz der Unterschiede der VWF-Konzentrationen nach Infektion mit Pneumokokken im Bezug zu nicht-infizierten Zellen ($p < 0,05$).

Die VWF-Konzentration im Zellkulturmedium der mit *S. pneumoniae* st35A-infizierten Zellen betrug $0,67 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ VWF (Abb. 24, st35Awt), während die VWF-Konzentration nach der Infektion mit der Mutante $0,34 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ VWF betrug (Abb. 24, st45A Δply). In den Zellkulturüberständen der Zellen, die während der Infektion von den Pneumokokken durch die semipermeable Membran getrennt waren, wurden niedrigere VWF-Konzentrationen quantifiziert als im Zellkulturüberstand der infizierten HPMEC (Abb. 24). Die VWF-Konzentrationen im HPMEC-Zellkulturüberstand ohne direkten Kontakt zu den Pneumokokken betrugen $0,39 \text{ U/ml} \pm 0,03 \text{ U/ml}$ VWF nach Inkubation mit dem Wildtyp (Abb. 24, st35Awt im TW) und $0,25 \text{ U/ml} \pm 0,04 \text{ U/ml}$ VWF nach Inkubation mit der Mutante (Abb. 24, st35A Δply im TW). Die Werte der VWF-Konzentrationen im Transwell-System waren

niedriger als die Werte der VWF-Konzentrationen der infizierten HPMEC ohne Trennung von Bakterien und Zellen, aber signifikant höher als die VWF-Konzentration im Medium der nicht-infizierten Zellen (Abb. 24). Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Sekretion von VWF durch sekretierte Pneumokokkenfaktoren stimuliert wird.

4.13 Funktion von Pneumolysin in der VWF-Sekretion

In den bisherigen Ergebnissen konnte gezeigt werden, dass sekretierte Pneumokokkenfaktoren die VWF-Sekretion aus HPMEC stimulieren. Die Analysen der VWF-Sekretion von Lungenendothelzellen nach Infektion mit Serotyps 35A-Pneumokokken wiesen einen Unterschied in der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand zwischen dem Wildtyp und der Pneumolysinmutante auf. Die Infektion mit dem Wildtyp führte zu höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von HPMEC als die Mutante. Das Pneumolysin von Pneumokokken ist ein Cholesterin-bindendes Zytotoxin, das Transmembranporen induziert und zur Lyse der Wirtszelle führt (Mitchell und Mitchell, 2010). Um die Funktion dieses sekretierten Zytotoxins in der Stimulierung der VWF-Sekretion näher zu untersuchen, wurden HPMEC mit rekombinantem Pneumolysin in sublytischen Konzentrationen von 1,0 ng/ml und 3,0 ng/ml für 2,5 Std. inkubiert. Des Weiteren erfolgte eine Koinkubation der Pneumolysin-defizienten Mutante und Pneumolysin. Im Anschluss wurden die VWF-Konzentrationen der Zellkulturüberstände in ELISA-Analysen quantifiziert. Darüber hinaus wurden HPMEC mit 3,0 ng/ml Pneumolysin in 30 Minuten-Intervallen von 0,5 Std. bis 4,5 Std. inkubiert und die VWF-Konzentrationen der Zellkulturüberstände bestimmt.

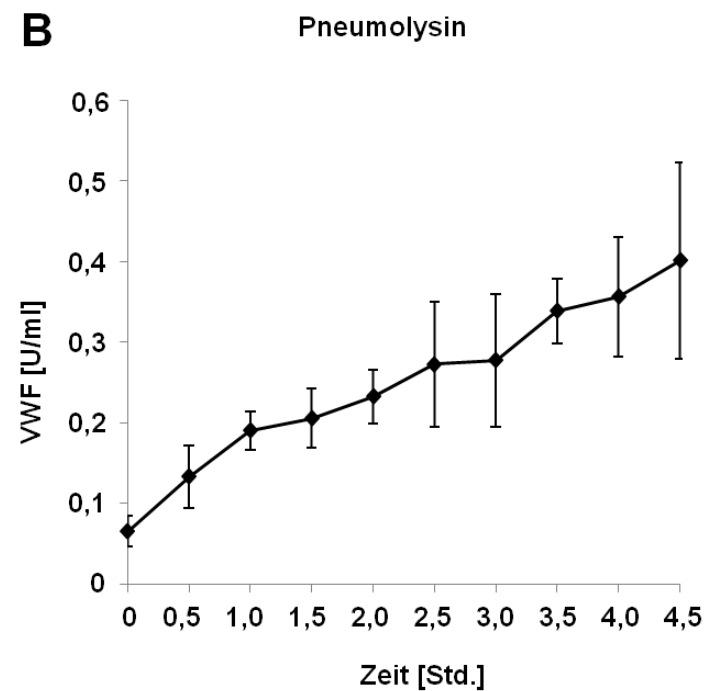
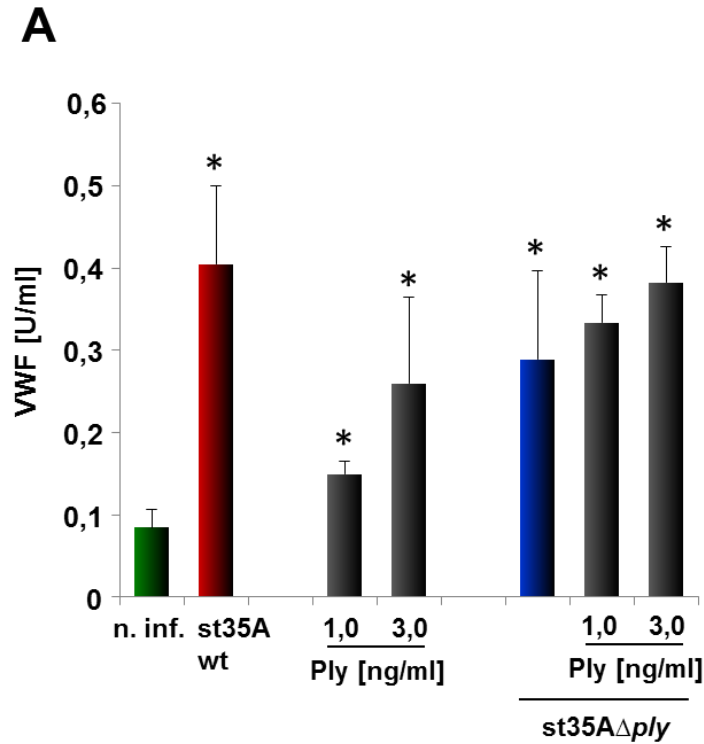


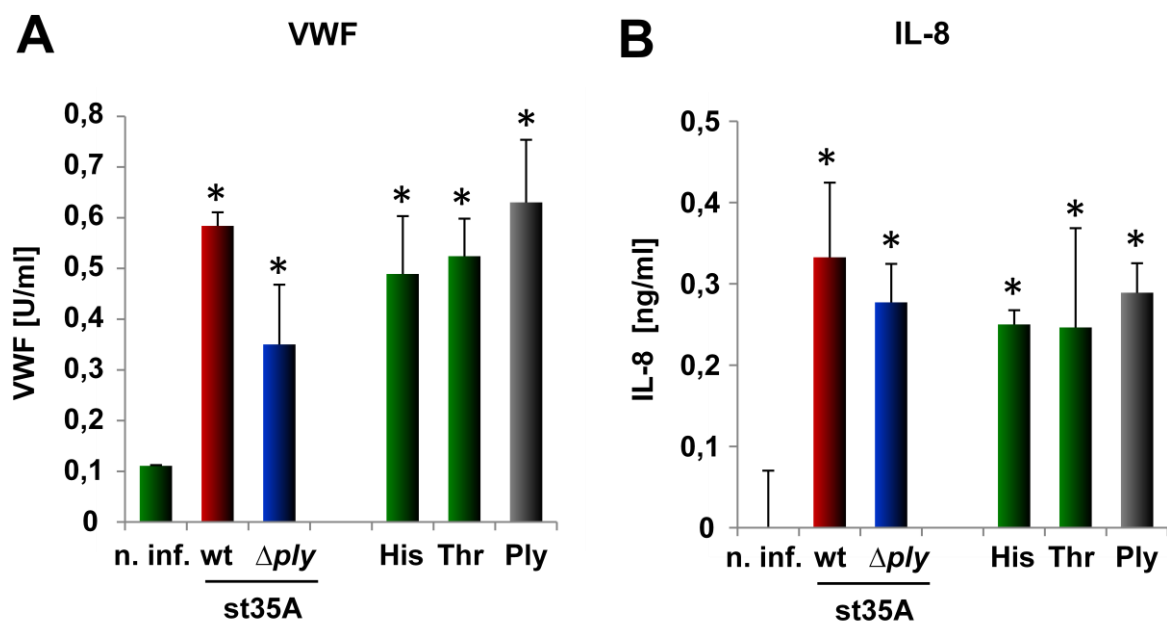
Abbildung 25: VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Pneumolysin. A) HPMEC wurden mit 1,0 ng/ml und 3,0 ng/ml Pneumolysin inkubiert und die VWF-Mengen im Zellkulturüberstand bestimmt. Zum Vergleich wurden die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand nach Infektion von HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A (st35A wt) und *S. pneumoniae* st35AΔply (st35AΔply) quantifiziert. Darüber hinaus wurden

HPMEC mit der Mutante und mit 1,0 ng/ml Pneumolysin bzw. 3,0 ng/ml Pneumolysin koinkubiert. **B)** VWF-Konzentrationen im Zellkulturmedium nach Inkubation mit 3,0 ng/ml Pneumolysin in 30-Minuten-Intervallen von 0,5 Std. bis 4,5 Std. *) Signifikanz der Unterschiede in den VWF-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen der Pneumokokken-infizierten und Pneumolysin-inkubierten Zellen zu nicht-infizierten HPMEC ($p < 0,05$).

Nach Infektion der HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A (st35A wt) betrug die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand $0,4 \text{ U/ml} \pm 0,1 \text{ U/ml}$ und nach Infektion mit der Mutante $0,29 \text{ U/ml} \pm 0,11 \text{ U/ml}$ (Abb. 25 A). Die Konzentration des VWF im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Inkubation mit 1 ng/ml Pneumolysin oder 3,0 ng/ml Pneumolysin ist geringer als nach Infektion mit dem Wildtyp oder der Mutante. Die VWF-Konzentration nach Inkubation mit 1,0 ng/ml Pneumolysin betrug $0,15 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ und nach Inkubation mit 3,0 ng/ml Pneumolysin $0,26 \text{ U/ml} \pm 0,1 \text{ U/ml}$ (Abb. 25 A). Diese Werte sind signifikant höher als die VWF-Konzentration von nicht-infizierten Zellen mit $0,09 \text{ U/ml} \pm 0,02 \text{ U/ml}$ (Abb. 25 A). Die Koinkubation von HPMEC mit der Pneumolysin-defizienten Mutante und Pneumolysin führte zu höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den VWF-Konzentrationen nach Infektion mit der Mutante oder nach Inkubation mit Pneumolysin. Die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Koinkubation von Mutante und 1,0 ng/ml Pneumolysin betrug $0,33 \text{ U/ml} \pm 0,03 \text{ U/ml}$ und nach Koinkubation von Mutante und 3,0 ng/ml Pneumolysin $0,38 \text{ U/ml} \pm 0,04 \text{ U/ml}$ (Abb. 25 A). Die VWF-Konzentration nach Koinkubation von Mutante und 3,0 ng/ml Pneumolysin ist vergleichbar mit der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Infektion mit dem Wildtyp (Abb. 25 A). Abbildung 25 B zeigt eine steigende VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC, die mit 3,0 ng/ml Pneumolysin in 30-Minuten-Intervallen inkubiert wurden. Die Konzentration des VWF erreichte bei 4,5 Std. ein Maximum von $0,4 \text{ U/ml} \pm 0,12 \text{ U/ml}$ (Abb. 25 B). Diese Untersuchungen zeigen, dass rekombinantes Pneumolysin die VWF-Sekretion der Endothelzellen stimuliert.

4.14 Vergleich der VWF- und IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand nach Infektion mit Pneumokokken und Inkubation mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin

Physiologische Agonisten, wie Thrombin und Histamin stimulieren die WPB-Exozytose aus Endothelzellen, z. B. bei Gefäßverletzungen (Rondaij *et al.*, 2006). Zum Vergleich der VWF- und IL-8-Sekretion nach Infektion von HPMEC mit Pneumokokken und nach Inkubation mit Pneumolysin mit der VWF- und IL-8-Sekretion nach Inkubation mit Thrombin und Histamin wurden HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A (st35A wt), *S. pneumoniae* st35A Δ ply (st35A Δ ply), 1 U/ml Thrombin, 1 mM Histamin und 3,0 ng/ml Pneumolysin für 2,5 Std. infiziert bzw. inkubiert. In ELISA-basierten Analysen wurden die VWF- und IL-8-Konzentrationen der Zellkulturüberstände quantifiziert. Darüber hinaus wurde die VWF-Sekretion von HPMEC nach Inkubation mit 1 U/ml Thrombin und 1 mM Histamin in 30-Minuten-Intervallen von 0,5 Std. bis 4,5 Std. analysiert.



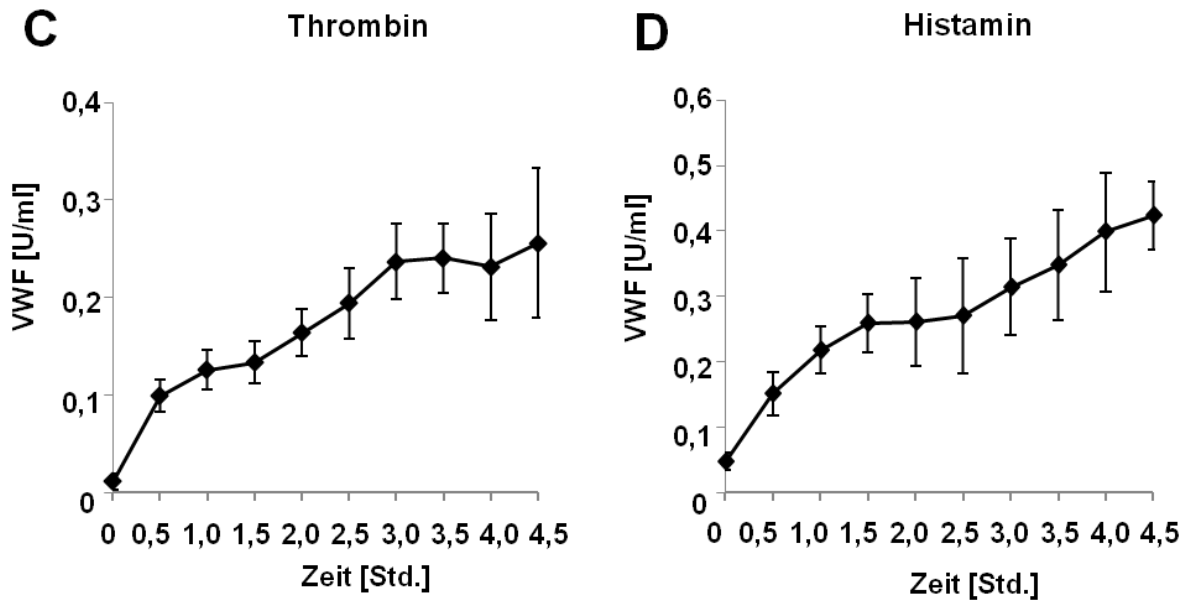


Abbildung 26: Stimulierung der VWF- und IL-8-Sekretion durch Pneumokokken, Histamin, Thrombin und rekombinantem Pneumolysin. A) VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC nach 2,5 Std. Infektion mit *S. pneumoniae* st35A (st35Awt) und *S. pneumoniae* st35A Δ ply (st35A Δ ply) im Vergleich zu der VWF-Konzentration nach Inkubation von HPMEC mit 1 mM Histamin (His), 1 U/ml Thrombin (Thr) sowie 3,0 ng/ml Pneumolysin (Ply) B) IL-8-Konzentration im Zellkulturmedium nach Infektion mit Wildtyp und Mutante im Vergleich zu der Konzentration nach Inkubation mit 1 mM Histamin (His), 1 U/ml Thrombin (Thr) sowie 3,0 ng/ml Pneumolysin (Ply). Die Liniendiagramme zeigen die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Inkubation mit 1 U/ml Thrombin (C) und 1 mM Histamin (D) in 30 Minuten-Intervallen von 0,5 Std. bis 4,5 Std. *) Signifikanz der VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der infizierten und inkubierten HPMEC im Bezug zu der VWF- und IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen ($p < 0,05$).

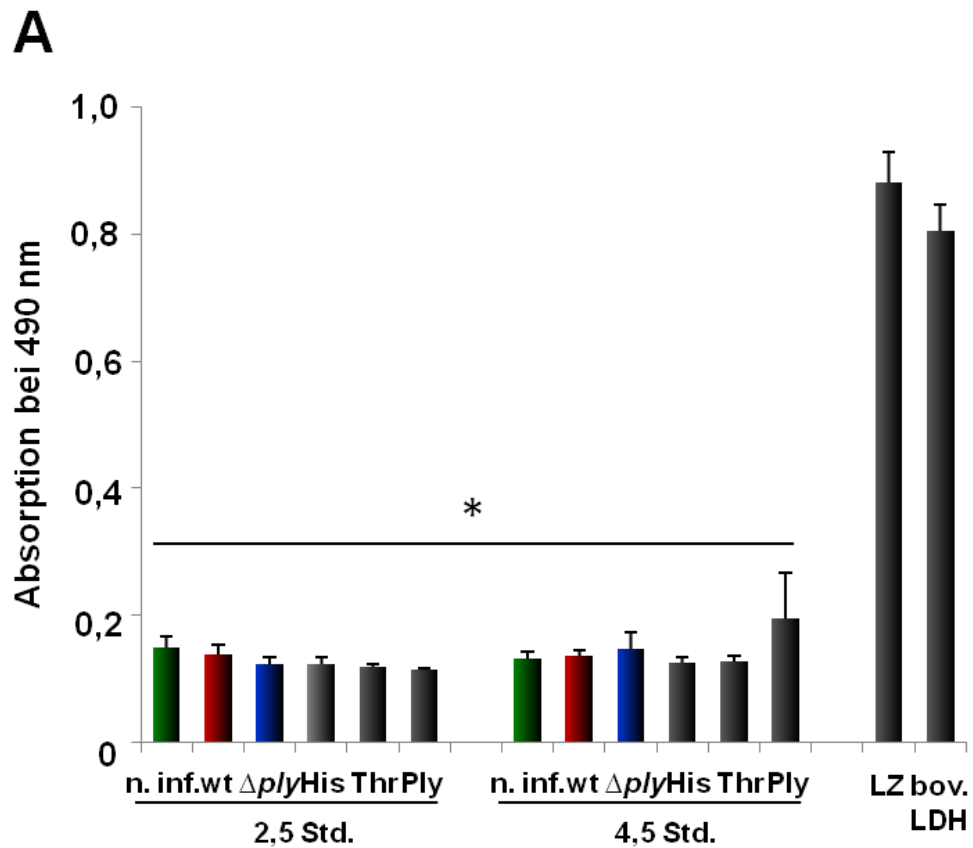
Die Inkubation von HPMEC mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin führte zu signifikant höheren VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand im Vergleich mit den VWF- und IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen (Abb. 26 A und B). Die VWF-Konzentration nach Inkubation der HPMEC mit Histamin betrug $0,49 \text{ U/ml} \pm 0,11 \text{ U/ml}$ und ist vergleichbar mit der VWF-Konzentration von $0,52 \text{ U/ml} \pm 0,07 \text{ U/ml}$ nach Inkubation mit Thrombin (Abb. 26 A). Nach Inkubation der Zellen mit 3,0 ng/ml Pneumolysin betrug die Konzentration an VWF $0,63 \text{ U/ml} \pm 0,12 \text{ U/ml}$ (Abb. 26 A). Die Konzentrationswerte von VWF nach Inkubation mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin sind vergleichbar mit der VWF-Konzentration nach Infektion der HPMEC mit dem

Pneumokokken-Wildtyp. Die Infektion mit dem Wildtyp stimulierte die Sekretion von $0,58 \text{ U/ml} \pm 0,03 \text{ U/ml}$ VWF in den Zellkulturüberstand der HPMEC (Abb. 26 A). Die VWF-Konzentration nach Infektion mit der Mutante war $0,35 \text{ U/ml} \pm 0,12 \text{ U/ml}$ (Abb. 26 A). Die IL-8-Konzentration von $0,33 \text{ ng/ml} \pm 0,09 \text{ ng/ml}$ im Zellkulturmedium nach Infektion mit dem Pneumokokken-Serotyp 35A ist vergleichbar mit der IL-8-Konzentration von $0,28 \text{ ng/ml} \pm 0,05 \text{ ng/ml}$ nach Infektion mit der Mutante (Abb. 26 B). Die Inkubation der Zellen mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin führte zu vergleichbaren IL-8-Konzentrationen im Zellkulturmedium wie die Infektion der Zellen mit dem Pneumokokken-Wildtyp und der Mutante. Die Inkubation mit Histamin induzierte die Sekretion von $0,25 \text{ ng/ml} \pm 0,02 \text{ ng/ml}$ IL-8 in das Zellkulturmedium, die Inkubation mit Thrombin $0,25 \text{ ng/ml} \pm 0,12 \text{ ng/ml}$ IL-8, während die Pneumolysin-Inkubation zu $0,29 \text{ ng/ml} \pm 0,04 \text{ ng/ml}$ IL-8 im Zellkulturüberstand führte (Abb. 26 B). Die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand stiegen durch Inkubation mit Thrombin von $0,01 \text{ U/ml} \pm 0,01 \text{ U/ml}$ zum Inkubationsstartpunkt auf $0,26 \text{ U/ml} \pm 0,08 \text{ U/ml}$ nach 4,5 Std. (Abb. 26 C), während die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Inkubation mit 1 U/ml Histamin von $0,05 \text{ U/ml} \pm 0,01 \text{ U/ml}$ VWF zum Startpunkt der Inkubation auf $0,42 \text{ U/ml} \pm 0,05 \text{ U/ml}$ nach 4,5 Std. anstiegen (Abb. 26 D).

4.15 Zytotoxizitätsanalyse von infizierten Lungenendothelzellen

Zur Kontrolle der Zellviabilität von HPMEC während der Infektion mit Pneumokokken und der Inkubation mit Thrombin, Histamin und Pneumolysin wurde die Menge zytoplasmatischer Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken und Inkubation mit Thrombin, Histamin und Pneumolysin detektiert. Die Menge an LDH im Zellkulturüberstand nimmt während der Nekrose und Apoptose von Zellen zu (Anleitung des Cyto Tox 96® Non-Radioactive Cytotoxicity Assay, Promega, USA). HPMEC wurden mit *S. pneumoniae* st35A (st35A wt), *S. pneumoniae* st35A Δ ply (st35A Δ ply), 1 U/ml Thrombin, 1 mM Histamin und $3,0 \text{ ng/ml}$ Pneumolysin für 2,5 Std. und 4,5 Std. inkubiert und der Zellkulturüberstand in der Zytotoxizitätsanalyse auf LDH überprüft. Von den Zellen freigesetzte LDH wurde durch Messung der Absorption bei 490 nm nachgewiesen. Als Negativ-Kontrolle wurden nicht-infizierte HPMEC verwendet. Die LDH-Freisetzung in den Zellkulturüberstand nach Infektion mit Pneumokokken und der Inkubation mit Thrombin, Histamin und Pneumolysin wurde mit der LDH-Freisetzung von lysierten HPMEC verglichen, während die Absorption von boviner LDH als Positiv-Kontrolle der Methode diente. In

fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen wurden das Aktin-Zytoskelett und die WPB-Menge von HPMEC nach Inkubation mit 1 U/ml Thrombin, 1 mM Histamin und 3,0 ng/ml Pneumolysin visualisiert. Das Aktin-Zytoskelett der HPMEC wurde mit rot fluoreszierendem Phalloidin und die WPBs mit VWF-spezifischen primären Antikörpern und grün fluoreszierenden Zweitantikörpern markiert.



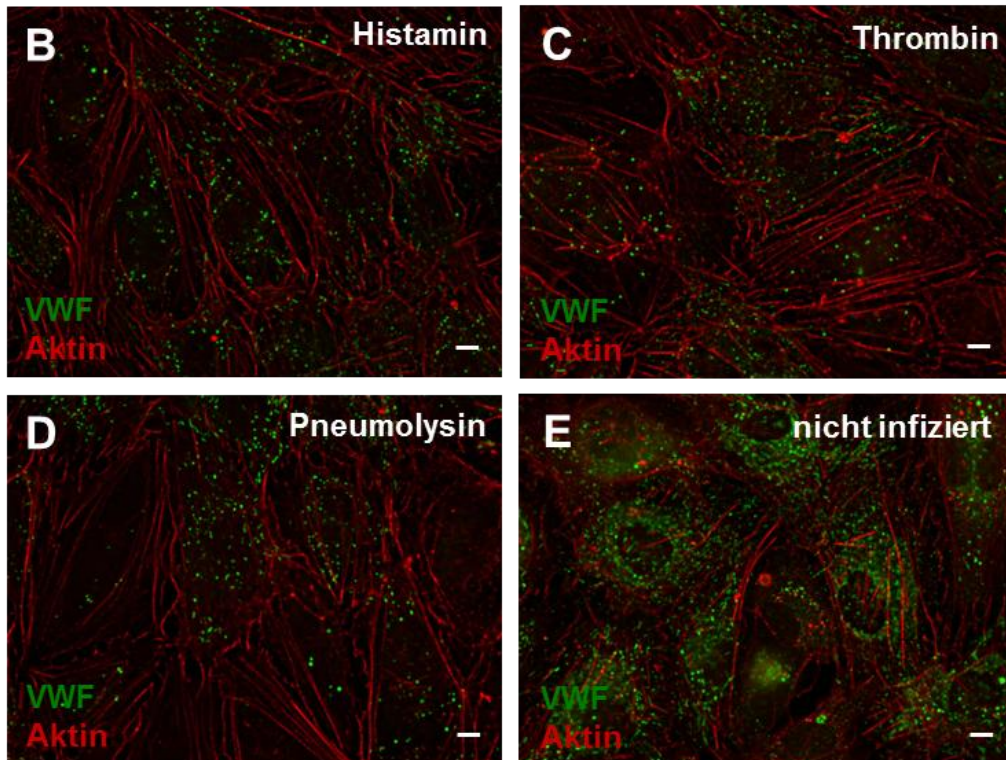
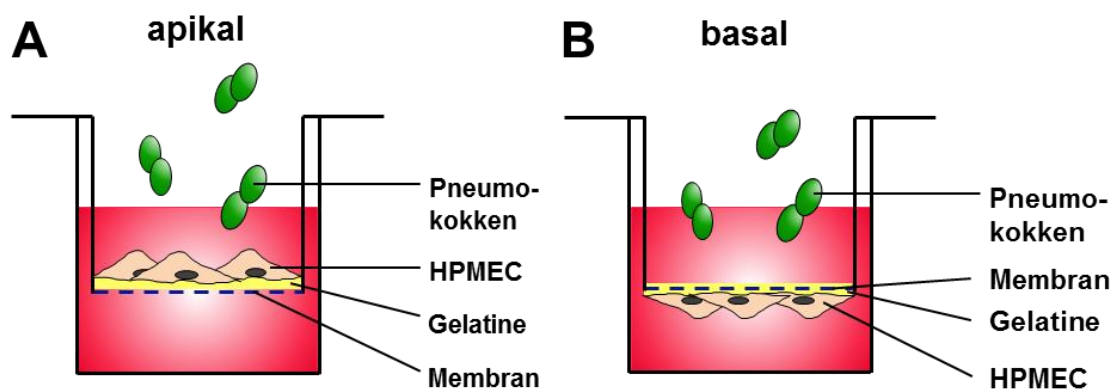


Abbildung 27: Zellviabilität und WPB-Menge von HPMEC nach Inkubation mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin. A) Das Diagramm zeigt die Absorption der Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Inkubation mit 1 mM Histamin, 1 U/ml Thrombin und 3,0 ng/ml Pneumolysin und nach Infektion mit *S. pneumoniae* st35A (wt) und *S. pneumoniae* st35A Δ ply (Δ ply). Die Infektion bzw. Inkubation erfolgte für 2,5 Std. und 4,5 Std.. Direkt im Anschluss wurde die LDH im Zellkulturüberstand durch Zytotoxizitätsanalyse detektiert. Die Absorption der LDH im Zellkulturüberstand von lysierten HPMEC (LZ) diente als Positiv-Kontrolle. Als Negativ-Kontrolle wurde die LDH im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten HPMEC (n. inf.) detektiert. Als weitere Positiv-Kontrolle wurde die Absorption von boviner LDH (bov. LDH) nachgewiesen. *) Signifikanz des Unterschieds der Absorption der LDH im Zellkulturüberstand von infizierten und inkubierten HPMEC zur Absorption der LDH von lysierten HPMEC ($p < 0,05$). **B-E)** Visualisierung des Aktin-Zytoskeletts und der WPB-Menge von HPMEC nach Inkubation mit 1 mM Histamin, 1 U/ml Thrombin und 3,0 ng/ml Pneumolysin. Die Detektion des Zytoskeletts erfolgte mit ALEXA-568-konjugiertem Phalloidin und die Detektion der WPBs mit VWF-spezifischen Antikörpern und einem ALEXA-488-konjugiertem Zweitantikörper. Zum Vergleich wurden das Zytoskelett und die WPB-Menge von nicht inkubierten Zellen dargestellt. Der Maßstab entspricht 10 μ m.

Nach der Infektion von HPMEC mit dem Serotyp 35A (wt) und dem Serotyp 35A Δ ply (Δ ply) und der Inkubation mit Thrombin; Histamin oder Pneumolysin für 2,5 Std. oder 4,5 Std. wurden im Vergleich zu lysierten HPMEC signifikant geringere Mengen LDH im Zellkulturüberstand detektiert. Die Detektion von LDH im Zellkulturüberstand von lysierten HPMEC führte zu Absorptionswerten von $0,88 \pm 0,05$ und ist vergleichbar mit der Absorption von $0,8 \pm 0,04$ von boviner LDH (Abb. 27 A). Die Absorption der LDH nach Infektion der Zellen mit dem Pneumokokken-Wildtyp betrug $0,14 \pm 0,02$ nach 2,5 Std.-Infektion und $0,14 \pm 0,01$ nach 4,5 Std.-Infektion (Abb. 27 A) und war vergleichbar mit den Absorptionswerten der Zytotoxizitätsanalyse von nicht-infizierten Zellen. Die Absorptionswerte von nicht-infizierten Zellen betrugen $0,15 \pm 0,02$ nach 2,5 Std.-Inkubation im Infektionsmedium und $0,13 \pm 0,01$ nach 4,5 Std.-Inkubation im Infektionsmedium (Abb. 27 A). Nach Infektion der HPMEC mit der Mutante wurde bei der Zytotoxizitätsanalyse eine Absorption von $0,12 \pm 0,01$ nach 2,5 Std.-Infektion und $0,15 \pm 0,02$ nach 4,5 Std.-Infektion detektiert (Abb. 27 A). Die Absorption der LDH nach Infektion mit Pneumokokken war vergleichbar mit der Absorption nach Inkubation der Zellen mit Histamin, Thrombin und Pneumolysin. Die Inkubation der HPMEC mit Histamin führte zu einer Absorption von $0,12 \pm 0,01$ nach 2,5 Std.-Inkubation und $0,13 \pm 0,01$ nach 4,5 Std.-Inkubation (Abb. 27 A). Die Absorption der LDH im Zellkulturüberstand nach Inkubation mit Thrombin betrug $0,12 \pm 0,004$ nach 2,5 Std.-Inkubation und $0,13 \pm 0,01$ nach 4,5 Std.-Inkubation (Abb. 27 A). Die Inkubation der Zellen mit Pneumolysin führte zu einer Absorption von $0,11 \pm 0,002$ nach 2,5 Std.-Inkubation und $0,19 \pm 0,07$ nach 4,5 Std.-Inkubation (Abb. 27 A). Die Absorption der LDH bei den Positiv-Kontrollen war signifikant höher als die Absorption in nicht-infizierten Zellen bzw. den infizierten oder inkubierten Zellen (Abb. 27 A). Der Nachweis geringer LDH-Mengen im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Infektion mit *S. pneumoniae* st35A (wt) und *S. pneumoniae* st35A Δ ply (Δ ply) und Inkubation mit 1 mM Histamin, 1 U/ml Thrombin und 3,0 ng/ml Pneumolysin deutet auf keine Schädigung der Zellen durch die Infektion oder die Inkubation. Die Visualisierung der mit Histamin, Thrombin oder Pneumolysin-inkubierten HPMEC bestätigte die Aussage des Zytotoxizitätstests. Die Zellen wiesen ein intaktes Aktin-Zytoskelett und keine erkennbare Schädigung der Zellstruktur auf (Abb. 27 B-E). Darüber hinaus zeigte die fluoreszenzmikroskopische Analyse, dass HPMEC nach Inkubation mit 1 mM Histamin, 1 U/ml Thrombin und 3,0 ng/ml Pneumolysin weniger WPBs enthalten als nicht-infizierte HPMEC (Abb. 27 B-E).

4.16 VWF- und IL-8-Sekretion von HPMEC nach apikaler und basaler Infektion mit Pneumokokken

Eine invasive Lungeninfektion mit Pneumokokken führt häufig zu einer Ausbreitung der Pneumokokken in tiefere Gewebeschichten des Körpers (Laterre *et al.*, 2005). Um von der Lunge in den Blutstrom zu gelangen, müssen invasive Pathogene die Luft-Blut-Schranke mit dem mikrovaskulären Lungenendothel überwinden. Diese Interaktion erfordert einen Kontakt der Pneumokokken mit der basalen Seite des mikrovaskulären Lungenendothels. Zur Charakterisierung der von der basalen Seite der Endothelzellen induzierten WPB-Exozytose in den Blutstrom, wurde ein Zweikammer-Transwell-System mit einer semipermeablen Membran mit 3,0 µm Porengröße benutzt. Ein Porendurchmesser von 3,0 µm erlaubt die Transmigration von Pneumokokken. HPMEC wurden einerseits auf der oberen Seite der Membran kultiviert, andererseits auf der unteren Seite der Membran (siehe Abb. 28 A und B). Die Zellen wurden anschließend für 4,5 Std. mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply infiziert (siehe Abb. 28). Nach der Infektion wurden die VWF- und IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand der HPMEC quantifiziert. Als Kontrolle wurde der Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen der apikalen und basalen Kultivierung analysiert.



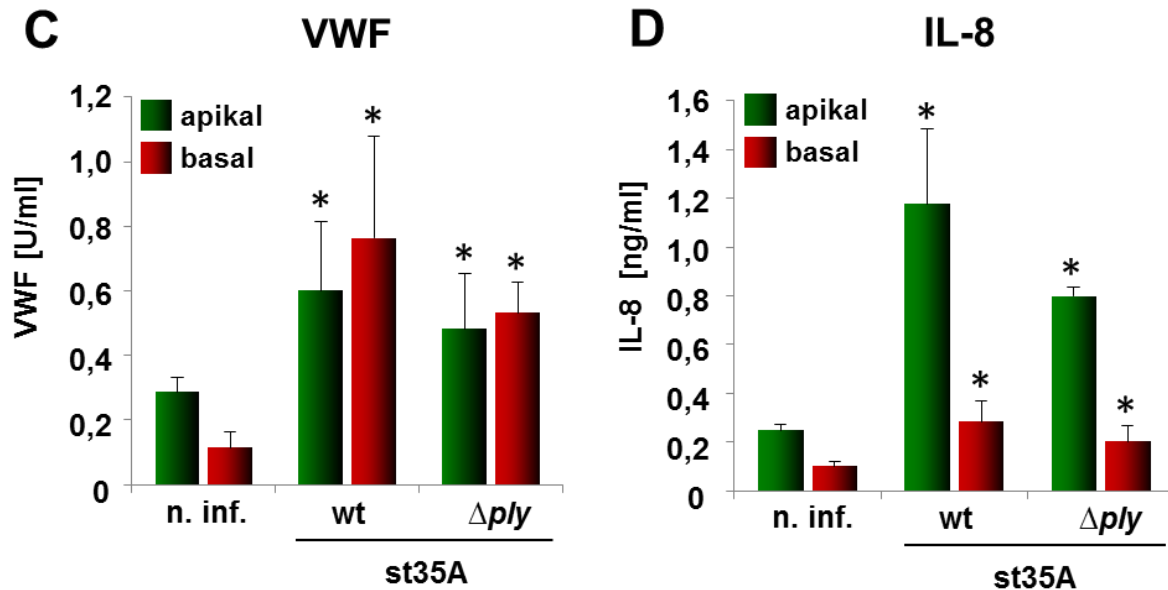


Abbildung 28: Sekretion von VWF und IL-8 nach apikaler und basaler Infektion von HPMEC. HPMEC wurden für 4,5 Std. mit *S. pneumoniae* st35A (st35Awt) und *S. pneumoniae* st35A Δply (st35A Δply) von der apikalen und basalen Seite der Zellschicht infiziert. **A)** Schema der apikalen Infektion im Zweikammer-Transwell-System. **B)** Schema der basalen Infektion der Zellschicht nach inverser Kultur der HPMEC auf der Membranunterseite. Anschließend wurde die VWF-Konzentration (**C**) und IL-8-Konzentration (**D**) der Zellkulturüberstände quantifiziert. Zur Kontrolle wurden die VWF- und IL-8-Konzentrationen von nicht-infizierten HPMEC nach der apikalen und basalen Kultivierung bestimmt (n. inf.). *) Signifikanz der Unterschiede der VWF- und IL-8-Konzentrationen von infizierten HPMEC nach der apikalen und basalen Kultivierung zu den VWF- und IL-8-Konzentrationen nicht-infizierten Zellen nach apikaler und basaler Kultivierung ($p < 0,05$).

Die Infektion der basalen Seite der HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A (st35Awt) führte zu vergleichbaren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand wie die Infektion von der apikalen Seite der HPMEC. Nach basolateraler Infektion mit dem Wildtyp betrug die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand $0,76 \text{ U/ml} \pm 0,31 \text{ U/ml}$ und nach apikaler Infektion $0,6 \text{ U/ml} \pm 0,21 \text{ U/ml}$ (Abb. 28 C). Die VWF-Konzentration nach Infektion mit *S. pneumoniae* st35A Δply (st35A Δply) von der basalen Seite betrug $0,53 \text{ U/ml} \pm 0,1 \text{ U/ml}$ und nach Infektion von der apikalen Seite $0,48 \text{ U/ml} \pm 0,17 \text{ U/ml}$ VWF (Abb. 28 C). Die VWF-Konzentration bei nicht-infizierten Zellen ist signifikant geringer als die VWF-Konzentration nach Infektion mit dem Wildtyp und der Mutante und betrug $0,11 \text{ U/ml} \pm 0,05 \text{ U/ml}$ nach basaler Infektion und $0,29 \text{ U/ml} \pm 0,05 \text{ U/ml}$ nach apikaler Infektion. Die IL-8-Konzentrationen nach apikaler und basaler Infektion mit dem Wildtyp und der Mutante sind signifikant höher als die IL-8-Konzentration von nicht-infizierten Zellen nach apikaler und basaler Kultivierung (Abb. 28 D).

Im Zellkulturüberstand von nicht-infizierten Zellen wurde eine IL-8-Konzentration von $0,1 \text{ ng/ml} \pm 0,02 \text{ ng/ml}$ IL-8 nach basaler Kultivierung und $0,28 \text{ ng/ml} \pm 0,02 \text{ ng/ml}$ IL-8 nach apikaler Kultivierung detektiert. Die IL-8-Konzentrationen nach der basalen Infektion der Zellen mit Wildtyp und Mutante waren signifikant geringer als nach apikaler Infektion der Zellen mit Wildtyp und Mutante und betrugen $0,28 \text{ ng/ml} \pm 0,08 \text{ ng/ml}$ IL-8 nach basaler Infektion mit *S. pneumoniae* st35A und $0,2 \text{ ng/ml} \pm 0,06 \text{ ng/ml}$ IL-8 nach basaler Infektion mit *S. pneumoniae* st35A Δ ply (Abb. 28 D). Die Infektion von der apikalen Seite führte zu IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von $1,18 \text{ ng/ml} \pm 0,3 \text{ ng/ml}$ IL-8 nach Infektion mit dem Wildtyp und $0,8 \text{ ng/ml} \pm 0,04 \text{ ng/ml}$ IL-8 nach Infektion mit der Mutante (Abb. 28 D). Die Ergebnisse zeigen, dass die Sekretion von VWF und IL-8 sowohl nach Infektion von apikaler Zellseite als auch von basaler Zellseite erfolgt.

5. Diskussion

Infektionen mit *Streptococcus pneumoniae* sind nach Angaben der Weltgesundheitsorganisation eine der Hauptursachen von akuten Erkrankungen (WHO, 2007). Besonders bei Personen mit Immunschwächeprädisposition können Pneumokokken schwere invasive Erkrankungen wie Lobärpneumonien, Sepsis und Meningitis auslösen (Marrie, 1999). Trotz verbesserter Präventions- und Behandlungsmethoden, sowie intensiver Erforschung der Infektionsmechanismen, verursacht *S. pneumoniae* jährlich weltweit circa zwei Millionen Todesfälle (Lynch and Zhan, 2010). Bei einer invasiven Pneumokokkeninfektion führt die Transmigration der Luft-Blut-Schranke in der Lunge zur Dissemination der Bakterien im vaskulären System (Laterre *et al.*, 2005; Moreland *et al.*, 2006). Die an den Transmigrationsprozessen beteiligten wirtseigenen Faktoren sowie die zugrunde liegenden Pathogenitätsmechanismen der Pneumokokken, wurden bislang kaum untersucht. Die Aufklärung der Mechanismen, die zu einer invasiven Ausbreitung der Pneumokokken im Blutsystem führen, ermöglicht die Entwicklung neuer Strategien zur Therapie und Prävention von invasiven Pneumokokkeninfektionen. Das mikrovaskuläre Lungenendothel stellt einen Hauptbestandteil der Luft-Blut-Schranke dar (Aird, 2007). In dieser Arbeit wurde die Interaktion von Pneumokokken mit primären, humanen, mikrovaskulären Lungenendothelzellen charakterisiert.

5.1 Oberflächenprofile primärer Endothelzellen

Endothelzellen in Zellkultursystemen mit immortalisierten Zellen verlieren oft viele ihrer physiologischen Eigenschaften. Die in dieser Arbeit gestellten infektionsbiologischen Fragestellungen wurden daher anhand von primären Endothelzellen untersucht. Primäre Zellen werden direkt nach der Isolation aus dem Gewebe kultiviert und können anschließend für wissenschaftliche Untersuchungen verwendet werden (Pelzer, 2009). Zunächst wurde eine nähere Charakterisierung von primären, humanen Endothelzellen aus den Blutkapillaren der Lunge (HPMEC) durchgeführt. In durchflusszytometrischen Analysen wurde die Expression von speziellen Differenzierungsmarkern und Oberflächenproteinen von

HPMEC mit der Expression auf der Oberfläche von humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC), einem vielfach verwendetem Endothel-Modell, verglichen. Des Weiteren wurde untersucht wie sich der Differenzierungsstatus von HPMEC und HUVEC in der Zellkultur von einer frühen Passage zu einer späteren Passage ändert. Endothelzellen exprimieren verschiedene, spezifische Marker, die sie von anderen Zelltypen unterscheiden. Zu diesen Markern zählt das *platelet endothelial cell adhesion molecule-1* (PECAM-1) und der *lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1). Die Detektion von PECAM-1 und LYVE-1 dient zur Unterscheidung von Endothelzellen aus dem Blutgefäßsystem zu Endothelzellen aus dem Lymphsystem (Partanen und Paavonen, 2001). In frühen Passagen konnte der Differenzierungsmarker PECAM-1 in großer Menge auf der Oberfläche von HPMEC und HUVEC nachgewiesen werden, während in einer späteren Passage eine schwache Expression des PECAM-1 auf der Oberfläche von HPMEC und HUVEC detektiert wurde. PECAM-1, das auch die Bezeichnung *cluster of differentiation 31* (CD31) trägt, eignet sich als spezifischer Marker für Endothelzellen, weil es von Endothelzellen und nicht von Epithelzellen, Fibroblasten oder Muskelzellen exprimiert wird (Newman, 1994; Newman, 1997; Kobayashi *et al.*, 2005). In differenzierten Endothelzellen liegt PECAM-1 an den Zell-Zell-Verbindungen des konfluenten Endothels konzentriert vor (Newman, 1997; Woodfin *et al.*, 2007; Privratsky *et al.*, 2011). Kallmann und Kollegen untersuchten das Expressionsprofil von primären, humanen Gehirnendothelzellen im Vergleich zu Endothelzellen der Nabelschnurvene (HUVEC) (Kallmann *et al.*, 2002). In Immunfluoreszenzfärbungen von Gewebeschnitten konnte PECAM-1 bei beiden Endothelzelltypen nachgewiesen werden (Kallmann *et al.*, 2002). Die Expressionsstudien dieser Arbeit bestätigen die Ergebnisse von Kallmann und Kollegen und zeigen, dass PECAM-1 als Marker für differenzierte, konfluente Endothelzellen auf der Oberfläche der primären Endothelzellen exprimiert wird. Die hohe Expression von PECAM-1 auf der Oberfläche der HPMEC und HUVEC in früher Passage verdeutlicht den hohen Differenzierungsstatus der Endothelzellen. Die schwache Expression von PECAM-1 in HPMEC und HUVEC später Passage deutet auf den Verlust des Endothelzellcharakters der Endothelzellen nach mehrmaliger Subkultur.

Die Expression des *lymphatic vascular endothelial hyaluronan receptor-1* (LYVE-1) auf der Oberfläche der HPMEC und HUVEC in früher Passage war im Vergleich zu der Expression von PECAM-1 sehr niedrig. In Passage 15 beider Endothelzelltypen war die Expression des LYVE-1 im Vergleich zu PECAM-1 sehr hoch. LYVE-1 ist ein Marker für lymphatische Endothelzellen und wird von vaskulären Endothelzellen nur in sehr geringen Mengen exprimiert (Podgrabinska *et al.*, 2002). Die geringe Expression von LYVE-1 auf der Oberfläche der HPMEC und HUVEC in früher Passage bestätigt den vaskulären Ursprung und den hohen Differenzierungsstatus der beiden Zelltypen. Die hohe Expression von LYVE-

1 und die niedrige Expression von PECAM-1 in späten Passagen der HPMEC und HUVEC verstärkt die These zum Verlust des Endothelzellcharakters der Zellen in späten Passagen.

Darüber hinaus wurde die Expression der Oberflächenrezeptoren β_1 -Integrin, β_3 -Integrin, $\alpha_v\beta_3$ -Integrin, α_2 -Integrin, des *platelet activating factor receptor* (PAFr) und des *urokinase plasminogen activating receptor* (uPAR) auf der Oberfläche der Endothelzellen untersucht. Zusätzlich wurde die Expression von extrazellulärem Fibronektin und von Willebrand Faktor (VWF) detektiert. Besonders auffallend bei HPMEC und HUVEC in Passage 3 ist die starke Expression der detektierten Integrine. Die Analyse zeigte eine sehr hohe Expression von β_1 -Integrin und $\alpha_v\beta_3$ -Integrin im Vergleich zu PECAM-1. Nach mehrmaliger Subkultur der Zellen war die Integrinexpression im Vergleich zur Expression von PECAM-1 deutlich niedriger als in Passage 3. Integrine sind Transmembranproteine von eukaryotischen Zellen, die dauerhaft in der Zellmembran verankert sind (Evans und Calderwood, 2007). Sie verbinden Endothelzellen untereinander und mit der extrazellulären Matrix. Sie sind daher am Aufbau der Endothelbarriere beteiligt (Evans und Calderwood, 2007). Kallmann und Kollegen untersuchten die Genexpression zwei verschiedener Endothelzelltypen und detektierten bei beiden Endothelzelltypen eine hohe Expression mehrerer Integrine, insbesondere β_1 -, α_v - und α_3 -Integrin (Kallmann *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der Expressionsstudie dieser Arbeit sind den Ergebnissen von Kallmann und Kollegen sehr ähnlich und deuten auf eine hohe Expression von verschiedenen Integrinen bei differenzierten, konfluenten Endothelzellen. Die niedrige Expression der Integrine in späteren Passagen weist auf den Verlust des Differenzierungsstatus der Endothelzellen.

Die Expression des *platelet activating factor receptor* (PAFr), des von Willebrand Faktor (VWF), des *urokinase plasminogen activating receptor* (uPAR) und von extrazellulärem Fibronektin war in Passage 3 im Vergleich zu PECAM-1 sehr niedrig. In Passage 15 war die Expression dieser Proteine ähnlich hoch wie die Expression von PECAM-1. Diese Ergebnisse verdeutlichen erneut die Veränderung in der Proteinexpression von HPMEC und HUVEC nach mehrmaliger Subkultur der primären Zellen.

Zusammenfassend zeigt diese Analyse die gleiche Expression der detektierten Differenzierungsmarker und Oberflächenproteine von HPMEC und HUVEC in früher Passage. Das sich ergebene Expressionsprofil der untersuchten Proteine ist den Expressionsprofilen von anderen Endothelzellen sehr ähnlich. Nach mehrmaliger Subkultur bis Passage 15 änderte sich das Expressionsprofil der Endothelzellen und unterschied sich deutlich von dem Expressionsprofil der frühen Passage. Diese Ergebnisse demonstrieren den Verlust des Endothelzellcharakters beider Zelltypen nach mehrmaliger Subkultur. Damit der Differenzierungsstatus der Endothelzellen in den folgenden Untersuchungen möglichst

physiologischen Bedingungen entspricht, wurden die Endothelzellen nur in frühen Passagen verwendet.

5.2 Adhärenz der Pneumokokken an humane Endothelzellen

Seit circa 15 Jahren ist bekannt, dass Pneumokokken an humane Zellen adhären und in sie invadieren (Talbot *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde unter Verwendung verschiedener *in-vitro*-Zellkulturinfektionsmethoden das Adhärenz- und Internalisierungsverhalten von *S. pneumoniae* st35A und einer Pneumolysin-defizienten Mutante in primäre Endothelzellen untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass Pneumokokken an HPMEC und HUVEC adhären. Längere Infektionszeiten und größere Bakterienmengen führten zu größeren Anzahlen adhärenter Pneumokokken. Die Anzahl adhärenter Pneumokokken war bei einer Infektionszeit von 3,0 Std. + 1,5 Std. und einer MOI von 75 am höchsten. Die Adhärenz der Pneumokokken an die Endothelzellen der Nabelschnur war geringer als die Adhärenz an die Lungenendothelzellen. Diese Ergebnisse lassen die Vermutung zu, dass Pneumokokken Lungen-spezifischere Adhäsine exprimieren, die eine Interaktion mit den zellulären Faktoren der Lungenendothelzellen vermitteln.

In den Studien dieser Arbeit zeigte die Pneumolysin-negative Mutante ähnliche Zahlen adhärenter Bakterien wie der Wildtyp. In den *in-vitro*-Studien von Moreland und Kollegen adhärierte eine Pneumolysin-defiziente Mutante des Serotyp 2 an Lungenendothelzellen und überwand in ähnlicher Menge wie der Serotyp 2-Wildtyp die Endothelbarriere (Moreland und Bailey, 2006). Die *in-vitro*-Infektionsexperimente dieser Arbeit bestätigten die Ergebnisse von Moreland und Kollegen. Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen zeigten Rubins und Kollegen in *in-vitro*-Infektionsexperimenten eine verringerte Adhärenz von Pneumolysin-defizienten Pneumokokken an respiratorische Epithelzellen (Rubins *et al.*, 1998). Diese Ergebnisse konnten in den *in-vitro*-Zellkulturinfektionen mit HPMEC nicht bestätigt werden, was auf eine geringere Beteiligung von Pneumolysin in der Adhärenz der Pneumokokken an Endothelzellen hindeutet. Die Funktion von Pneumolysin auf die Adhärenz der Pneumokokken an Endothelzellen könnte in weiteren *in-vitro*-Zellkulturinfektionen mit Pneumolysin-defizienten Pneumokokken anderer Serotypen und verschiedener Endothelzelltypen weiter analysiert werden.

Auf Grund der Ergebnisse der Adhärenzstudien mit HPMEC und HUVEC wurden für die weiteren Experimente Lungenendothelzellen verwendet. Um den Einfluss von Zellschäden

durch hohe Bakterienmengen oder lange Infektionszeiten zu mindern, wurden die folgenden Infektionen bei 3,0 Std. + 1,5 Std. und einer MOI von 50 durchgeführt.

5.3 Genexpressionsanalyse humaner Lungenendothelzellen nach Infektion mit Pneumokokken

Die Mikroarray-Technologie ist für eine breitgefächerte Analyse der Wirtsantwort hervorragend geeignet, da sie die gleichzeitige Untersuchung der Genexpression von tausenden Genen ermöglicht. In den Mikroarray-Analysen dieser Arbeit wurde die Änderung der Genexpression von humanen Lungenendothelzellen nach Infektion mit *S. pneumoniae* st35A und der Pneumolysinmutante des Serotyp 35A untersucht. Es handelte es sich um eine Voll-Genom-Analyse, für die ein Affimetrix-Chip mit Nukleotiden, die 54.000 humane Gene repräsentieren, verwendet wurde. Die Infektion von HPMEC mit dem Wildtyp-Stamm führte zu einer veränderten Genexpression von 372 Genen, wobei die Infektion mit der Pneumolysin-defizienten Mutante zu einer Änderung der Genexpression bei 81 Genen führte. Ein Beispiel für die signifikant erhöhte Expression nach der Infektion mit Pneumokokken ist Interleukin-8 (IL-8). IL-8 ist ein 8 kDa großes Zytokin des angeborenen Immunsystems und gehört zur Familie der Chemokine (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). IL-8 wurde nach der Infektion mit dem Wildtyp 6,6-fach stärker und nach der Infektion mit der Mutante 5,6-fach stärker exprimiert als bei nicht-infizierten HPMEC. In Mikroarray-Analysen von Bootsma und Kollegen resultierte die Interaktion eines stark bekapselten Pneumokokkenstammes (*S. pneumoniae* st2) und einer Kapselmutante (*S. pneumoniae* st2 Δ cps) mit humanen Epithelzellen in der stärkeren Expression von 322 Genen (Bootsma *et al.*, 2007). Hierbei handelte es sich hauptsächlich um Genprodukte, die an der Immunantwort der Zelle beteiligt sind, wie z. B. IL-8. Die Ergebnisse von Bootsma und Kollegen sind den Ergebnissen der Genexpressionsstudie dieser Arbeit sehr ähnlich. Des Weiteren konnten Bootsma und Kollegen in ihren Studien ebenfalls eine signifikant stärkere Expression von IL-8 nach Infektion mit Pneumokokken detektieren. Rogers und Kollegen analysierten die transkriptionelle Antwort humaner Monozyten auf Infektion mit *S. pneumoniae* st2 und einer Pneumolysin-defizienten Mutante des Serotyp 2 (Rogers *et al.*, 2003). Sie identifizierten 182 Gene, einschließlich IL-8, die nach Pneumokokkeninfektion eine veränderte Genexpression aufwiesen (Rogers *et al.*, 2003). Eine Pneumokokkeninfektion von humanen Monozyten resultierte wie die Infektion von Lungenendothelzellen in einer signifikant stärkeren

Expression von IL-8. Diese Ergebnisse bestätigen die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse mit den Lungenendothelzellen.

Zur Evaluierung der Microarray-Analyse wurden Real time PCR-Analysen des *il-8*-Gens vorgenommen. Die Real time PCR ermöglicht eine quantitative Genexpressionsanalyse. Für die Untersuchung der Genexpression wurden HPMEC mit *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ *ply* infiziert, die RNS der Zellen isoliert, in cDNS umgeschrieben und mit der cDNS Real time-PCR-Analysen durchgeführt. Die Genexpression des *il-8*-Gens wurde mit der Genexpression des *house keeping* Gens *rps9* verglichen. Das Gen *rps9* codiert für das ribosomale Protein S9 der 40S-Untereinheit und wurde bereits vielfach für Genexpressionsanalysen beschrieben (Bionaz und Loor, 2007). Die Real time PCR-Analyse des *il-8*-Gens detektierte eine signifikante Erhöhung der Genexpression nach Infektion der HPMEC mit dem Wildtyp im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Die Genexpression von IL-8 in HPMEC nach Infektion mit der Mutante beträgt nur die Hälfte der Genexpression nach der Infektion mit dem Wildtyp. Bootsma und Kollegen nutzten ebenfalls die Real time PCR-Analyse zur Evaluierung ihrer Mikroarray-Daten (Bootsma *et al.*, 2007). In den Analysen wurde die erhöhte Expression des *il-8*-Gens in Epithelzellen nach Infektion mit Pneumokokken im Vergleich zu nicht-infizierten Epithelzellen festgestellt. Die Resultate der Real time PRC-Analyse der infizierten Lungenendothelzellen in dieser Arbeit gleichen den Ergebnissen der Real time PCR-Analyse von Bootsma und Kollegen und bestätigen die Ergebnisse der Microarray-Analyse. Sie demonstrierten die signifikant höhere Expression von IL-8 in Lungenendothelzellen nach Infektion mit Pneumokokken im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen.

5.4 Korrelation der Pneumokokkenadhärenz und der WPB-Menge in HPMEC

Das Zytokin IL-8 wird in Endothelzellen in spezifischen Organellen, den Weibel-Palade bodies (WPBs) gespeichert (Rondaij *et al.*, 2006; Valentijn *et al.*, 2011). Die WPB-Bildung in Endothelzellen korreliert mit der Konfluenz des Endothels und wurde als ein wichtiger Parameter für den Differenzierungsstatus von Endothelzellen der Nabelschnur beschrieben (Howell *et al.*, 2004). Um für die nachfolgenden Analysen gleiche Ausgangsbedingungen zu schaffen, wurde zunächst die konfluenzabhängige WPB-Bildung in HPMEC untersucht. Dazu wurde der Anteil an WPB-positiven Zellen in HPMEC-Zellschichten nach Kultivierung bis

zum Erreichen unterschiedlicher Konfluenzen bestimmt. In nicht konfluent-gewachsenen HPMEC lagen die Zellen einzeln und die Menge an WPB-positiven Zellen war sehr gering im Vergleich zur Menge WPB-positiver Zellen in konfluenten HPMEC. Bei einer konfluenten Zellschicht HPMEC waren mehr als zwei Drittel der Zellen WPB-positiv. In sub-konfluenten HPMEC wurde ein geringerer Anteil an WPB-positiven Zellen detektiert. Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die Studien von Howell und Kollegen und zeigen, dass die WPB-Bildung in Endothelzellen mit der Konfluenz der primären Lungenendothelschicht korreliert. Auf Grund dieser Ergebnisse wurde vor den Experimenten zur WPB-Exozytose die Konfluenz der HPMEC mikroskopisch kontrolliert und nur konfluente Zellschichten verwendet.

Eine genaue Quantifizierung des Konfluenzstatus von HPMEC erfolgte durch Verwendung eines cellZscope®-Messgerätes (NanoAnalytics, Deutschland), dass die biologische Impedanz durch Messung des transendothelialen Widerstandes (TER) und der elektrischen Kapazität (C_{cl}) bestimmt. Die Zellen verbinden sich über *tight junctions* untereinander zu einer konfluenten Schicht mit einem maximalen Widerstand und einer minimalen Kapazität (Information des Herstellers). Im Verlauf der Kultivierung der HPMEC war ein Anstieg des transendothelialen Widerstandes auf einen Maximalwert von $25 \Omega/\text{cm}^2 \pm 0,5 \Omega/\text{cm}^2$ zu beobachten. Zum Zeitpunkt des maximalen Widerstandes der Zellschicht betrug die Kapazität $0,5 \mu\text{F}/\text{cm}^2 \pm 0,12 \mu\text{F}/\text{cm}^2$. Zur Widerstandsmessung von Endothelzellen mit dem cellZscope® gibt es bislang keine Literatur. Moreland und Bailey beobachteten die Widerstandsänderungen von immortalisierten mikrovaskulären Lungenendothelzellen (Clonetics, USA) im Zweikammer-Transwell-System mit einem End Ohm *epithelial volthmeter* (World Precision Instruments, USA). Das End Ohm *epithelial volthmeter* misst den elektrischen Widerstand zu einem Zeitpunkt der Kultivierung, während das cellZscope® Messungen des elektrischen Widerstandes und der Kapazität in kurzen Abständen über die Dauer der Kultivierung ermöglicht. Die endothelialen Zellschichten in den Studien von Moreland und Bailey erreichten Widerstandswerte von $34\text{-}37 \Omega/\text{cm}^2$. Dieser Widerstandwert für die immortalisierten Lungenendothelzellen ist den Messwerten der primären Lungenendothelzellen des cellZscope® ähnlich. Die Zunahme des Widerstandes und die Abnahme der Kapazität während der Kultivierung der HPMEC deuten auf die Zunahme der Konfluenz der Zellschicht. Der Maximalwert des Widerstandes deutet auf das Erreichen der maximalen Konfluenz der Zellschicht.

Die Ergebnisse zur konfluenzabhängigen WPB-Bildung demonstrierten, dass eine konfluente Zellschicht Lungenendothelzellen aus mehr als zwei Drittel WPB-positiven- und demzufolge weniger als ein Drittel WPB-negativen Zellen besteht. In fluoreszenzmikroskopischen Analysen wurde die Adhärenz von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply an

WPB-positive und WPB-negative HPMEC untersucht. In weiteren Untersuchungen wurde der Anteil der WPB-positiven und -negativen HPMEC während der Infektion mit den Pneumokokken quantifiziert. Die Ergebnisse der Analysen zeigten eine inverse Korrelation zwischen der Menge adhärenter Pneumokokken und dem prozentualen Anteil WPB-positiver Zellen im Bezug zur Gesamtzellzahl infizierter Zellen. Während des Infektionsverlaufes wurde der prozentuale Anteil an WPB-positiven Zellen weniger, während die Menge adhärenter Pneumokokken zunahm. Die Korrelation zwischen dem abnehmenden prozentualen Anteil WPB-positiver HPMEC und der zunehmenden Zahl adhärenter Pneumokokken an den Zellen deutete auf eine Kontakt-abhängige Exozytose der WPBs im Verlauf einer Infektion mit dem Pneumokokken-Wildtyp und der Mutante. Die Induktion der WPB-Exozytose durch Bakterien wurde bisher nur in Studien mit den intrazellulären Bakterien *Rickettsia rickettsii* und *Rickettsia conorii* veröffentlicht. Rickettsien sind obligat intrazelluläre bakterielle Parasiten, die das Rocky-Mountain-Fleckfieber verursachen können (Silverman *et al.*, 1984; Walker und Mattern, 1985). Sie invadieren in humane Endothelzellen, können sich intrazellulär replizieren und sich von Zelle zu Zelle ausbreiten (Silverman *et al.*, 1984). Der Zusammenhang der Menge intrazellulärer Rickettsien mit der WPB-Menge in humanen Endothelzellen wurde in *in-vitro*-Zellkulturinfektionen mit HUVEC analysiert (Sporn *et al.*, 2010). Sporn und Kollegen detektierten die inverse Korrelation von internalisierten Rickettsien und der WPB-Menge in infizierten Endothelzellen (Sporn *et al.*, 2010). Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit Rickettsien wurde bei den Analysen mit Pneumokokken die inverse Korrelation zwischen dem Anteil an WPB-positiven Zellen und der Zahl adhärenter Pneumokokken festgestellt. In verschiedenen *in-vitro*-Zellkulturinfektionen dieser Arbeit konnte die Internalisierung von Pneumokokken in HPMEC und HUVEC gezeigt werden. Obgleich die Zahl internalisierter Pneumokokken in HPMEC größer war als in HUVEC handelt es sich bei Pneumokokken um obligat adhärente Bakterien. Diese Feststellung lässt die Vermutung zu, dass bereits der Kontakt der Pneumokokken mit den Endothelzellen die WPB-Exozytose induzieren könnte.

5.5 Sekretion von VWF nach Infektion mit Pneumokokken

Bei der Exozytose von WPBs werden die WPB-Bestandteile in die Umgebung der Endothelzelle sekretiert (Rondaij *et al.*, 2006). Neben IL-8 enthalten WPBs noch weitere Proteine, z. B. von Willebrand Faktor (VWF), ein multimeres Glykoprotein mit essentiellen Funktionen in der Hämostase (Fiedler *et al.*, 2004; Valentijn *et al.*, 2011). Die Bestimmung

der Pneumokokkenadhärenz an WPB-positive und -negative Zellen und die Untersuchung der Menge der WPB-positiven Zellen nach Infektion mit Pneumokokken deuteten darauf hin, dass die Pneumokokkenadhärenz die WPB-Exozytose aus HPMEC stimuliert. Um die These der WPB-Exozytose nach Pneumokokkeninfektion zu überprüfen, wurden quantitative Analysen zur Detektion der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von infizierten HPMEC durchgeführt. Im Zellkulturüberstand von Pneumokokken-infizierten HPMEC konnten signifikant höhere VWF-Konzentrationen im Vergleich zum Zellkulturüberstand von nicht-infizierten HPMEC nachgewiesen werden. In Untersuchungen von Sporn und Kollegen wurde die VWF-Sekretion von HUVEC nach Infektion mit Rickettsien analysiert (Sporn *et al.*, 1991). Nach der Infektion wurden VWF-Moleküle im Zellmedium detektiert, während in den Zellen kein VWF nachzuweisen war (Sporn *et al.*, 1991). Eine Infektion von humanen Endothelzellen mit dem Herpes Simplex Virus (HSV) führte ebenfalls zur Sekretion von VWF-Molekülen (Etingin *et al.*, 1993). In Übereinstimmung mit den Studien von Sporn und Kollegen, sowie mit den Ergebnissen von Etingin und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Infektion von Lungenendothelzellen mit Pneumokokken zur Sekretion von VWF führt. Der Nachweis von höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von infizierten Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen bestätigt die These, dass die Adhärenz von Pneumokokken die WPB-Exozytose induziert.

Im humanen Organismus führt die Exozytose von WPBs zu einer Sekretion von bis zu einigen Millimetern langen VWF-Fäden in das Blutplasma (Dong *et al.*, 2002). Im Blutplasma ist VWF ein wichtiger Faktor der primären und sekundären Hämostase (Wagner, 1990). Die Infektion von Endothelzellen mit Rickettsien führte sowohl zu höheren VWF-Konzentrationen, als auch zu höheren Fibrinogen-Konzentrationen im Plasma (Sporn *et al.*, 1991). Eine starke Schädigung des Endothels und die Aktivierung der Hämostase führen zur disseminierten, intravasalen Koagulopathie, in deren Folge durch übermäßigen Verbrauch an Gerinnungsfaktoren eine starke Blutungsneigung resultiert (Sporn *et al.*, 1991; McKay, 1965). Ähnliche klinische Symptome, wie z. B. die fibrine Hepatisierung der Lunge, eine Nekrose des Lungengewebes, wurden für eine Pneumokokken-induzierte Lungenentzündung beschrieben (Wollheim, 1913, Blake, 1920). Diese Feststellungen könnten darauf hinweisen, dass in Pneumokokken-induzierten Lungenentzündungen eine Stimulierung des Lungenendothels erfolgt, die zur Sekretion von VWF in den Blutstrom führt.

Die Stimulierung von Endothelzellen mit den physiologischen Agonisten Thrombin und Histamin führt zur Exozytose von WPBs (Rondaij *et al.*, 2006). Die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken wurden mit den sekretierten VWF-Konzentrationen nach Inkubation der Zellen mit Histamin und Thrombin verglichen. Die Ergebnisse veranschaulichen, dass die Infektion von HPMEC mit

Pneumokokken zu gleichen VWF-Konzentrationen im Infektionsmedium führt wie nach Inkubation der Zellen mit den physiologischen Agonisten Histamin und Thrombin. Diese Resultate geben den Hinweis auf die Pneumokokken-induzierte VWF-Sekretion in physiologisch relevanten Konzentrationen.

Zur Kontrolle der Zellviabilität von HPMEC während der Infektion mit Pneumokokken und der Inkubation mit Thrombin und Histamin wurde die Menge zytoplasmatischer Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand der Zellen detektiert. Nach Infektion der HPMEC mit Pneumokokken und Inkubation mit Histamin und Thrombin wurden im Zellkulturüberstand der Zellen geringe Mengen LDH im Vergleich zu lysierten HPMEC nachgewiesen. Die Detektion geringer LDH-Mengen im Zellkulturüberstand von HPMEC deutet auf keine Schädigung der Zellen durch die Infektion oder die Inkubation. Die Visualisierung der mit Pneumokokken-infizierten HPMEC und der mit Histamin oder Thrombin-inkubierten HPMEC zeigte ein intaktes Aktin-Zytoskelett und keine erkennbare Schädigung der Zellstruktur und bestätigte die Aussage des LDH-Nachweises. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die erhöhte Konzentration von VWF im Zellkulturüberstand der Zellen nach Infektion mit Pneumokokken nicht auf eine Schädigung der Zellstruktur zurückzuführen ist, sondern auf die Sekretion der Proteine.

Darüber hinaus zeigte die fluoreszenzmikroskopische Analyse, dass HPMEC nach Inkubation mit Histamin und Thrombin weniger WPBs enthalten als nicht-infizierte HPMEC. Dieses Ergebnis bestätigt die Studien zur Induktion der WPB-Exozytose mit Histamin oder Thrombin.

5.6 IL-8-Sekretion nach Infektion mit Pneumokokken

Zur Bestätigung der WPB-Exozytose nach Infektion mit Pneumokokken wurde die IL-8-Sekretion von infizierten Lungenendothelzellen untersucht. Dazu wurde die IL-8-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken quantifiziert. Die Infektion der Lungenendothelzellen mit Pneumokokken führte zu signifikant hohen IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der Zellen im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen. Das Zytokin IL-8 ist ubiquitär im Zytoplasma von Endothelzellen vorhanden und wird in die WPBs der Endothelzellen eingelagert. Nach Aktivierung der Endothelzellen wird IL-8 in den Blutstrom sekretiert (Fiedler *et al.*, 2004; Valentijn *et al.*, 2011; Rondaij *et al.*, 2006; Metcalf *et al.*, 2008). Die Hauptfunktion von IL-8 besteht in der Förderung der

Chemotaxis von Granulozyten (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992; Romani de Wit *et al.*, 2003). Während einer Infektion wandern vor allem neutrophile Granulozyten anhand des IL-8-Gradienten zum Infektionsherd (Brat *et al.*, 2005). Als chemotaktisches Zytokin fördert IL-8 die Migration von Endothelzellen in die extrazelluläre Matrix (EZM) des infizierten Gewebes (Li *et al.*, 2003). IL-8 ist auch maßgeblich an der Immunabwehr von Pneumokokken beteiligt (Madsen *et al.*, 2000). In Studien von Madsen und Kollegen induzierte die Adhärenz von Pneumokokken die IL-8-Produktion in humanen Lungenepithelzellen und bestätigt damit die Beteiligung von IL-8 in invasiven Pneumokokkeninfektionen (Madsen *et al.*, 2000).

Zur Untersuchung der Histamin- und Thrombin-induzierten IL-8-Sekretion wurden die IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der HPMEC nach Inkubation mit Histamin und Thrombin analysiert. Die IL-8-Konzentrationen nach Inkubation der Zellen mit Histamin und Thrombin wurden mit den IL-8-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Infektion mit Pneumokokken verglichen. Die Inkubation mit den physiologischen Agonisten führte zu signifikant hohen Konzentrationen von IL-8 im Infektionsmedium. Hierbei handelt es sich sehr wahrscheinlich um sekretierte WPB-Komponenten. Die Infektion von HPMEC mit Pneumokokken führte zu gleichen IL-8-Konzentrationen im Infektionsmedium wie die Inkubation der Zellen mit den physiologischen Agonisten Histamin und Thrombin. Diese Ergebnisse verdeutlichen die Pneumokokken-induzierte Sekretion von WPB-Komponenten in physiologisch relevanten Konzentrationen.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse, dass eine Infektion von Lungenendothelzellen mit Pneumokokken die Sekretion der WPB-Komponenten VWF und IL-8 induziert.

5.7 VWF-Sekretion nach Inkubation mit Pneumokokkenmembranproteinen

Um die Funktion von Pneumokokkenmembranproteinen in der Adhärenz-vermittelten WPB-Exozytose zu untersuchen, wurden die Membranproteine von *S. pneumoniae* st35A und *S. pneumoniae* st35A Δ ply präpariert und mit HPMEC inkubiert. Anschließend wurde die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand quantifiziert. Die Inkubation von HPMEC mit Pneumokokkenmembranproteinen führte zu signifikant erhöhten VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der Zellen, im Vergleich zu nicht-infizierten HPMEC. Die Sekretion von VWF könnte durch Interaktion eines Adhäsins der Pneumokokkenoberfläche mit einem Rezeptor der Endothelzelloberfläche induziert werden. Einige Oberflächenproteine von

S. pneumoniae sind an Wirt-Pathogen-Interaktionen beteiligt (Bergmann und Hammerschmidt, 2006). Das *pneumococcal surface antigen A* (PsaA) ist ein in der Pneumokokkenmembran verankertes Lipoprotein, das die Adhärenz von Pneumokokken an eukaryotische Zellen vermittelt (Berry und Paton, 1996). Die Cholinbindungsproteine *pneumococcal surface protein A* (PspA) und *pneumococcal surface protein C* (PspC) von Pneumokokken sind nicht-kovalent mit den Phosphorylcholingruppen der Lipoteichon- und Teichonsäuren der Pneumokokkenzellwand assoziiert. PspA und PspA vermitteln die Adhärenz von Pneumokokken an humane respiratorische Zellen. Bei dem PspC-ähnlichen Protein *factor H binding inhibitor of complement* (Hic) handelt es sich um ein kovalent über LPXTG-Motiv in der Zellwand verankertes Molekül, dass mit verschiedenen Komponenten des Immunsystems wie z. B. Faktor H interagiert (Hammerschmidt *et al.*, 2007). Die Interaktion zwischen PspC/Hic und Faktor H erhöht die Adhärenz der Pneumokokken an humane Epithel- und Endothelzellen (Hammerschmidt *et al.*, 2007). Als Adhäsine auf der Pneumokokkenoberfläche könnten die Virulenzfaktoren PsaA, PspA, PspC oder Hic die Sekretion von VWF induzieren. In *in-vitro*-Studien mit rekombinanten Proteinen könnte die Funktion der Proteine in der WPB-Exozytose untersucht werden. Die Identifizierung des Faktors der Pneumokokkenmembran, der die VWF-Sekretion induziert, würde entscheidend zur Charakterisierung der WPB-Exozytose durch Pneumokokken beitragen.

Zur Untersuchung der Induktion der VWF-Sekretion durch oberflächenassoziierte Faktoren Gram-positiver Bakterien wurden HPMEC mit einer Lipoteichonsäurepräparation (LTA) von *Staphylococcus aureus* inkubiert. LTA induzierte die Sekretion von VWF. Into und Kollegen präparierten LTA und Peptidoglykan von *Staphylococcus aureus*. In *in-vitro*-Studien mit humanen Endothelzellen der Aorta wurde gezeigt, dass die Inkubation mit LTA von *S. aureus* zu einer Sekretion von VWF führt (Into *et al.*, 2007). Die Ergebnisse zur Induktion der VWF-Sekretion durch Inkubation mit LTA aus dieser Arbeit stimmen mit den Ergebnissen von Into und Kollegen überein und bestätigen die Induktion der VWF-Sekretion durch LTA von *Staphylococcus aureus*. Um die Induktion der VWF-Sekretion durch oberflächenassoziierte Faktoren Gram-negativer Bakterien zu bestimmen wurden HPMEC mit einer Lipopolysaccharid-Präparation (LPS) von *Salmonella typhimurium* inkubiert. LPS von *S. typhimurium* induzierte ebenfalls die Sekretion von VWF aus HPMEC. Im Gegensatz zu den Ergebnissen dieser Arbeit führte die Inkubation von Endothelzellen mit LPS von *Escherichia coli* und *Salmonella minnesota* in den Studien von Into und Kollegen zu keiner signifikanten VWF-Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (Into *et al.*, 2007). Die Ergebnisse der *in-vitro*-Inkubationsversuche der HPMEC mit LTA und LPS demonstrierten, dass LTA und LPS die Sekretion von VWF aus Endothelzellen induzieren. Die Versuche zeigten aber auch, dass die Inkubation mit Pneumokokkenmembranproteinen zu deutlich höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand führt als LTA und LPS. Diese Beobachtungen deuten

darauf hin, dass Pneumokokkenmembranproteine ein Hauptauslöser der WPB-Exozytose sind.

5.8 Stimulierung der VWF-Sekretion durch stark bekapselte Serotyp 2 Pneumokokken und andere Bakterienstämme

Die Ausprägung und Zusammensetzung der Polysaccharidkapsel bei Pneumokokken bestimmt in hohem Maße die Virulenz des Pneumokokken-Serotyps (Watson und Musher, 1990). Bekapselte Stämme sind in der Regel hoch virulent, während unbekapselte Stämme meist avirulent sind (Watson und Musher, 1990). Die unterschiedliche Kapselausprägung führt daher zu unterschiedlichen Krankheitsbildern der Serotypen. In vorangegangenen Studien konnte gezeigt werden, dass Pneumokokken vom Serotyp 35A die WPB-Exozytose aus Lungenendothelzellen induzieren. Die Induktion der VWF-Sekretion durch andere Serotypen und die Funktion der Polysaccharidkapsel wurde nach Infektion von HPMEC mit einem stark-bekapselten Serotyp-2-Pneumokokkenstamm und einer Kapselmutante untersucht. Bei der Kapselmutante erfolgte eine Deletion der Kapselgene. Die Pneumokokken können daher keine Kapsel produzieren. Nach der Infektion der Zellen mit den Serotyp-2-Pneumokokken wurden die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand quantifiziert. Die Infektion von HPMEC mit dem Serotyp 2 resultierte wie bei dem Serotyp 35A in einer signifikant höheren Sekretion von VWF in den Zellkulturüberstand. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, dass die WPB-Exozytose durch Pneumokokken nicht Serotyp-abhängig erfolgt. In Analysen mit weiteren Serotypen könnte diese These überprüft werden. Darüber hinaus führte die Infektion mit der Kapselmutante zu höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand als die Infektion der Zellen mit dem Wildtyp. Studien von Overweg und Kollegen veranschaulichten, dass die Kapselpolysaccharide zu einer Maskierung der Pneumokokkenoberfläche führen (Overweg *et al.*, 2000). In Studien von Hammerschmidt und Kollegen wurde gezeigt, dass die Mutation der Kapselgene von Pneumokokken die Anzahl adhärenter Bakterien an humane Lungenepithelzellen erhöht (Hammerschmidt *et al.*, 2005). Die Mutation der Kapselgene bei der Kapselmutante erhöhte vermutlich die Adhärenz an die HPMEC, während die stark ausgeprägte Kapsel des Wildtyps die Adhärenz an die Endothelzellen behinderte. Die höhere Anzahl der adhärenen Kapselmutanten könnte die stärkere VWF-Sekretion induziert haben. Im Organismus variiert die Menge des produzierten Kapselpolysaccharids im Verlauf einer Infektion gemäß der Lokalisierung der Pneumokokken (Hammerschmidt *et al.*, 2005). So wird die Kapselgenexpression im Organismus bei der

Adhärenz an Wirtszellen verringert. Die kapselabhängige Adhärenz an Lungenendothelzellen im Zusammenhang mit der Induktion der VWF-Sekretion könnte durch Infektionsanalysen mit Kapselmutanten unterschiedlicher MOI analysiert werden.

Zur Untersuchung der Induktion der VWF-Sekretion durch andere Bakterienstämme, wurden HPMEC mit verschiedenen Gram-positiven und Gram-negativen Bakterien infiziert und die VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand bestimmt. Bei jedem Bakterienstamm konnte eine signifikant höhere VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand im Vergleich zu nicht-infizierten Zellen nachgewiesen werden. Allerdings resultierte die Infektion mit den Bakterien in sehr unterschiedlichen VWF-Mengen. Die unterschiedlichen Konzentrationen von VWF sind vermutlich auf das unterschiedliche Adhärenzverhalten der Bakterienstämme zuzückzuführen. Die Adhärenz an humane Endothelzellen wurde bislang für *Staphylococcus aureus* und *Neisseria meningitidis*, der Erreger der zerebrospinalen Meningitis, gezeigt (Ogawa *et al.*, 1985; Coureuil *et al.*, 2009). Die Sekretion von VWF nach Infektion mit den untersuchten Bakterienstämmen wurde bislang nicht untersucht. Die Ergebnisse geben einen Hinweis darauf, dass die Induktion der VWF-Sekretion kein Pneumokokken-spezifischer Prozess ist.

5.9 Funktion von Pneumolysin in der WPB-Exozytose

Die bisherigen Ergebnisse zeigten den Einfluss der Pneumokokken und ihrer Membranproteine auf die Sekretion von VWF aus Endothelzellen. Um den Einfluss von sekretierten Pneumokokkenfaktoren auf die VWF-Sekretion zu untersuchen, wurden *in-vitro*-Infektionen mit dem Serotyp 35A und dem Serotyp 35A Δ ply in einem Zweikammer-Transwell-System vorgenommen und die VWF-Konzentrationen im Infektionsmedium der unteren Kammer in ELISA-Analysen quantifiziert. Die VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand der HPMEC ohne direkten Kontakt zu den Pneumokokken waren signifikant höher als die VWF-Konzentrationen bei nicht-infizierten HPMEC, aber niedriger im Vergleich zu den Infektionen ohne Trennung der Bakterien von den Zellen. Diese Ergebnisse verdeutlichen, dass die Sekretion von VWF nicht nur nach direktem Kontakt mit Pneumokokken, sondern auch durch sekretierte Pneumokokkenfaktoren stimuliert wird. Da die Membran für die Pneumokokken undurchlässig war, handelte es sich bei den Induktoren der VWF-Sekretion wahrscheinlich um freigesetzte Faktoren der Pneumokokken.

In den vorangegangenen Experimenten im Zweikammer-Transwell-System konnte gezeigt werden, dass sekretierte Pneumokokkenfaktoren die VWF-Sekretion von Lungenendothelzellen stimulieren. Das Zytotoxin Pneumolysin ist ein wichtiger Virulenzfaktor von Pneumokokken. Es handelt sich um ein porenbildendes Exotoxin, das während des Bakterienwachstums und nach Autolyse der Pneumokokken freigesetzt wird (Mitchell, 2000; 2003). Es wird neben Streptolysin O, Listeriolysin, Perfringolysin und Alveolysin zu den thiol-aktivierten Toxinen gezählt (Boulnois, 1992). Porenbildende Exotoxine sind amphipatische Proteine, die mit Lipidketten und Membranproteinen von Zielzellen interagieren (Bhakdi *et al.*, 1996). Durch die Bindung von Pneumolysin an das Cholesterin von eukaryotischen Doppellipidmembranen werden Transmembranporen induziert (Morgan *et al.*, 1994; 1995). Das Innere der Pore bildet einen hydrophilen Kanal, der den Fluss von Ionen erlaubt (Bhakdi *et al.*, 1996). Die Transmembranporen können zur Lyse von Epithel- und Endothelzellen führen, was die Barrierefunktion der Vaskulatur stark herabsetzt (Mitchell, 2010). Zur Untersuchung der Funktion des Pneumolysins in der WPB-Exozytose wurden Pneumolysin-defiziente Mutanten des Serotyp 35A und des Serotyp 2 im Vergleich zu den Wildtypstämmen des Serotyp 35A und 2 in verschiedenen *in-vitro*-Infektionsversuchen verwendet und die Induktion der VWF-Sekretion überprüft. Bei den Pneumolysinmutanten erfolgte die Deletion des Pneumolysingens. Die Pneumokokken sind daher nicht in der Lage Pneumolysin zu exprimieren. Eine Doppelmutante des Serotyp 2 mit einem deletierten Pneumolysingen und einer Deletion des Kapselgenlocus kann weder Pneumolysin exprimieren, noch eine Kapsel bilden. Die Infektionen mit den Wildtyp-Pneumokokken führten zu höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand von HPMEC als die Infektion mit den Mutanten. Diese Beobachtung deutet auf die Beteiligung von Pneumolysin an der Induktion der VWF-Sekretion.

Um die Funktion von Pneumolysin in der Stimulierung der VWF-Sekretion näher zu untersuchen, wurden HPMEC mit rekombinantem Pneumolysin in zwei sublytischen Konzentrationen inkubiert und die VWF-Konzentrationen der Zellkulturüberstände in ELISA-Analysen quantifiziert. Die Inkubation von HPMEC mit rekombinantem Pneumolysin induzierte die Sekretion von VWF und bestätigt damit die These, dass Pneumolysin die VWF-Sekretion stimuliert. Des Weiteren geben die Untersuchungen den Hinweis einer konzentrationsabhängigen Stimulierung der VWF-Sekretion nach der Inkubation der Zellen mit Pneumolysin. Darüber hinaus erfolgte die Quantifizierung der VWF-Konzentration im Zellkulturüberstand von HPMEC nach Koinkubation der Pneumolysin-defizienten Mutante und Pneumolysin. Die Koinkubation von HPMEC mit der Pneumolysin-defizienten Mutante und Pneumolysin führte zu höheren VWF-Konzentrationen im Zellkulturüberstand im Vergleich zu den VWF-Konzentrationen nach Infektion mit der Pneumolysin-defizienten Mutante oder nach Inkubation mit Pneumolysin allein. Diese Untersuchungen verdeutlichen,

dass neben der Adhärenz der Pneumokokken das Zytotoxin Pneumolysin die Exozytose von WPBs stimuliert.

Für eine gezielte Abwehr der Pneumokokken durch das humane Immunsystem, ist die Unterscheidung zwischen wirtseigenen und fremden Strukturen wichtig. Endothelzellen erkennen Mikroorganismen durch spezifische Rezeptoren auf ihrer Oberfläche (Underhill und Ozinsky, 2002). Die Familie der Toll-artigen Rezeptoren (TLR) spielt z. B. eine essentielle Rolle in der Erkennung mikrobieller Bestandteile (Akira *et al.*, 2001). Die TLR der Endothelzellen erkennen spezifische, konservierte, molekulare Muster von Mikroorganismen (*pathogen associated molecular patterns*, PAMPs) (Akira *et al.*, 2001). Auf Endothelzellen konnten die TLR 1-10 nachgewiesen werden (Edfeld *et al.*, 2002). Es wurde gezeigt, dass Pneumolysin mit Toll-like Rezeptoren der Klasse vier (TLR4) auf Makrophagen und Epithelzellen interagiert (Malley *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 2005; Mitchell, 2003; Marriott *et al.* 2008). Diese Interaktionen führten zu einer Freisetzung von TNF- α , Interleukin-6 und Interleukin-8 (Malley *et al.*, 2003; Dogan *et al.*, 2011). Die Inkubationsexperimente mit Pneumolysin weisen auf einen Zusammenhang der TLR4-Interaktion von Pneumolysin mit der Pneumolysin-induzierten WPB-Exozytose.

Zur Kontrolle der Zellviabilität der Lungenendothelzellen nach der Inkubation mit Pneumolysin wurde die Menge zytoplasmatischer Laktatdehydrogenase (LDH) im Zellkulturüberstand der Zellen nachgewiesen. Nach Inkubation der HPMEC mit Pneumolysin wurden im Zellkulturüberstand nur geringe Mengen LDH im Vergleich zu lysierten HPMEC detektiert. Geringe LDH-Mengen im Zellkulturüberstand geben den Hinweis, dass während der Inkubation mit Pneumolysin keine Schädigung der Zellen erfolgte. Die Visualisierung der Pneumolysin-inkubierten HPMEC zeigte ein intaktes Aktin-Zytoskelett und keine Schädigung der Zellstruktur und bestätigte damit die Aussage des LDH-Nachweises. Durch dieses Experiment konnte gezeigt werden, dass die erhöhte Konzentration von VWF im Zellkulturüberstand der Zellen nach Inkubation mit Pneumolysin nicht auf eine Schädigung der Zellen zurückzuführen ist, sondern auf die Sekretion von VWF.

5.10 VWF- und IL-8-Sekretion von HPMEC nach apikaler und basaler Infektion mit Pneumokokken

Eine invasive Pneumokokkeninfektion beginnt mit der Kolonisierung des oberen respiratorischen Atmungstraktes, der Ausbreitung der Pneumokokken in die Bronchien,

gefolgt von der Verbreitung in den Lungenalveolen (Gray *et al.*, 1980; Garcia-Rodriguez und Fresnadillo-Martinez, 2002). Um von der Lunge in den Blutstrom zu gelangen, müssen die Pneumokokken die Luft-Blut-Schranke überwinden (Garcia-Vidal *et al.*, 2010; Lee *et al.*, 1991). Diese Interaktion erfordert den Kontakt der Pneumokokken mit der basalen Seite des mikrovaskulären Lungenendothels. Zur Untersuchung der von der basalen Seite der Endothelzellen induzierten Sekretion von VWF und IL-8 wurden HPMEC in einem Zweikammer-Transwell-System mit einem Porendurchmesser von 3,0 µm inkubiert und nach Erreichen des Konfluenzstatus mit dem Serotyp 35A-Wildtyp und der Pneumolysinmutante infiziert. Anschließend wurde die Konzentrationen von VWF und IL-8 im Zellkulturüberstand der Zellen in ELISA-Analysen bestimmt. Die Sekretion von VWF und IL-8 erfolgte sowohl nach Infektion von apikaler Zellseite als auch von basaler Zellseite. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass die Stimulierung der WPB-Exozytose von beiden Seiten, sowohl vom Inneren der Blutkapillare als auch vom Lungengewebe in den Blutstrom erfolgt. Die Konzentration an VWF im Zellkulturüberstand war bei beiden Infektionswegen sehr ähnlich. Im Gegensatz dazu war die Konzentration von IL-8 nach apikaler Infektion höher als nach basaler Infektion. Valentijn und Kollegen zeigten, dass sowohl der WPB-Inhalt, als auch die WPB-Exozytose streng regulierte Prozesse der Endothelzelle sind, wobei VWF immer der Hauptbestandteil der WPBs ist (Valentijn *et al.*, 2011). Einige der WPB-Proteine, wie P-Selectin und Osteoprotegerin werden durch die Interaktion mit VWF aktiv in den WPB geschleust, während andere Proteine, wie Angiopoietin-2 und IL-8 VWF-unabhängig in die WPBs eingelagert werden (Fiedler *et al.*, 2004; Valentijn *et al.*, 2011). Die Studien von Valentijn und Kollegen beschreiben eine selektive und Stimulanz-abhängige WPB-Exozytose, die die Unterschiede in den IL-8-Konzentrationen nach apikaler und basaler Infektion erklären könnten.

An der Luft-Blut-Schranke ist die frühe Endothelantwort auf eine Pneumokokkeninfektion ein wichtiger Schritt zur Abwehr von invasiven Erkrankungen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass *S. pneumoniae* die Sekretion von pro-koagulativen und pro-inflammatorischen Komponenten induziert, die direkt in pathophysiologische Prozesse involviert sind. In weiterführenden Studien könnten die Mechanismen der Interaktion der Pneumokokken mit humanem Endothel detaillierter analysiert werden. Die Identifizierung der WPB-Exozytose-induzierenden Faktoren, sowohl der wirtseigenen, als auch der Pneumokokkenfaktoren, könnte von essentieller Bedeutung für das Verständnis der molekularen Abläufe von invasiven Pneumokokkeninfektionen sein. Die Aufklärung der Pathogenitätsmechanismen von Pneumokokken bei der Infektion des humanen Endothels und der Ausbreitung im

vaskulären System trägt maßgeblich dazu bei, neue Strategien in der Krankheitsvorsorge und Therapie von invasiven Pneumokokkeninfektionen zu entwickeln.

6. Referenzen

Adamou J.E., Wizemann T.M., Barren P., Langermann S. (1998) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to human bronchial epithelial cells (BEAS-2B). *Infect Immun* **66(2)**: 820-2.

Adnot S., Raffestin B., Eddahibi S. (1995) NO in the lung. *Respir Physiol* **101(2)**: 109-20.

Agarwal V., Asmat T.M., Dierdorf N.I., Hauck C.R., Hammerschmidt S. (2010) Polymeric immunoglobulin receptor-mediated invasion of *Streptococcus pneumoniae* into host cells requires a coordinate signaling of SRC family of protein-tyrosine kinases, ERK, and c-Jun N-terminal kinase. *J Biol Chem* **285(46)**: 35615-23.

Agarwal V., Asmat T.M., Dierdorf N.I., Hauck C.R., Hammerschmidt S. (2009) Cdc42 and the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway are essential for PspC-mediated internalization of pneumococci by respiratory epithelial cells. *J Biol Chem* **284(29)**: 19427-36.

Aird W.C. (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: I. Structure, function, and mechanisms. *Circ Res* **100(2)**: 158-73.

Aird W.C. (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ Res* **100(2)**: 174-90.

Akira S., Yamamoto M., Takeda K. (2003) Role of adapters in Toll-like receptor signalling. *Biochem Soc Trans* **31(Pt 3)**: 637-42.

Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P., Molekularbiologie der Zelle. 4. Auflage, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co KG aA

AlonsoDeVelasco E., Verheul A.F., Verhoef J., Snippe H. (1995) *Streptococcus pneumoniae*: virulence factors, pathogenesis, and vaccines. *Microbiol Rev* **59(4)**: 591-603.

Anderton J.M., Rajam G., Romero-Steiner S., Summer S., Kowalczyk A.P., Carlone G.M., Sampson J.S., Ades E.W. (2007) E-cadherin is a receptor for the common protein pneumococcal surface adhesin A (PsaA) of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb Pathog* **42(5-6)**: 225-36.

Augustin H.G., Kozian D.H., Johnson R.C. (1994) Differentiation of endothelial cells: analysis of the constitutive and activated endothelial cell phenotypes. *Bioessays* **16(12)**: 901-6.

Austrian R., Douglas R.M., Schiffman G., Coetzee A.M., Koornhof H.J., Hayden-Smith S., Reid R.D.W. (1976) Prevention of pneumococcal pneumonia by vaccination. *Trans. Assoc. Am. Physicians*. **89**: 184-194, 1976.

Baggiolini M., Clark-Lewis I. (1992) Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*. **307(1)**. 97-101.

Balachandran P., Hollingshead S.K., Paton J.C., Briles D.E. (2001) The autolytic enzyme LytA of *Streptococcus pneumoniae* is not responsible for releasing pneumolysin. *J Bacteriol.* **183(10)**:3108-16.

Baklaja R., Pešić M.Č., Czarneck J. (2005) Hemostasis and hemorrhagic disorders. *Fermentation-Biotec GmbH Bad Harzburg.*

Banerjee A., Van Sorge N.M., Sheen T.R., Uchiyama S., Mitchell T.J., Doran K.S. (2010) Activation of brain endothelium by pneumococcal neuraminidase NanA promotes bacterial internalization. *Cell Microbiol* **12(11)**: 1576-88.

Baron D.A. Lofton C.E., Newman W.H., Currie M.G. (1989) Atriopeptin inhibition of thrombin-mediated changes in the morphology and permeability of endothelial monolayers. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86(9)**: 3394-8.

Benner E.J., Munzinger J.P., Chan R. (1974) Superinfections of the lung. An evaluation by serial transtracheal aspirations. *West J Med* **121(3)**: 173-8.

Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (1986)

Bergmann S. and Hammerschmidt S. (2006) Versatility of pneumococcal surface proteins. *Microbiology* **152(Pt 2)**: 295-303.

Bergmann S., Lang A., Rohde M., Agarwal V., Rennemeier C., Grashoff C., Preissner K.T., Hammerschmidt S. (2009) Integrin-linked kinase is required for vitronectin-mediated internalization of *Streptococcus pneumoniae* by host cells. *J Cell Sci* **122(Pt 2)**: 256-67.

Bergmann S., Rohde M., Chhatwal G.S., Hammerschmidt S. (2001) alpha-Enolase of *Streptococcus pneumoniae* is a plasmin(ogen)-binding protein displayed on the bacterial cell surface. *Mol Microbiol* **40(6)**: 1273-87.

Bergmann S., Rohde M., Preissner K.T., Hammerschmidt S. (2005) The nine residue plasminogen-binding motif of the pneumococcal enolase is the major cofactor of plasmin-mediated degradation of extracellular matrix, dissolution of fibrin and transmigration. *Thromb Haemost.* **94(2)**: 304-11.

Berry A., Yother J., Briles D., Hansman D., and Paton J. (1989) Reduced virulence of a defined pneumolysin-negative mutant of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **57**: 2037–2042.

Berry A.M., Lock R.A., Hansman D., Paton J.C. (1989) Contribution of autolysin to virulence of *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **57**: 2324- 2330

Bhakdi S., Bayley H., Valeva A., Walev I., Walker B., Kehoe M., Palmer M. (1996) Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and *Escherichia coli* hemolysin: prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch Microbiol* **165(2)**: 73-9.

Bionaz M., Loor J.J. (2007) Identification of reference genes for quantitative real-time PCR in the bovine mammary gland during the lactation cycle. *Physiol Genomics*.**11**;**29(3)**:312-9.

Blitzer M.L., Lee S.D., Creager M.A. (1996) Endothelium-derived nitric oxide mediates hypoxic vasodilation of resistance vessels in humans. *Am J Physiol* **271(3 Pt 2)**: H1182-5.

Bonfanti R., Furie B.C., Furie B., Wagner D.D. (1989) PADGEM (GMP140) is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **73(5)**: 1109-12.

- Borchiellini A., Fijnvandraat K., ten Cate J.W., Pajkrt D., van Deventer S.J., Pasterkamp G., Meijer-Huizinga F., Zwart-Huinink L., Voorberg J., van Mourik J.A. (1996)** Quantitative analysis of von Willebrand factor propeptide release in vivo: effect of experimental endotoxemia and administration of 1-deamino-8-D-arginine vasopressin in humans. *Blood* **88(8)**: 2951-8.
- Boulnois, G.J. (1992)** Pneumococcal proteins and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *J Gen Microbiol* **138(2)**: 249-59.
- Brat D.J., Bellail A.C., Van Meir E.G. (2005)** The role of interleukin-8 and its receptors in gliomagenesis and tumoral angiogenesis. *Neuro-oncology* **7(2)**: 122-33.
- Brown J.H. (1919)** The use of blood agar for the study of streptococci. New York, The Rockefeller Institut for Medical Research, *Monograph No 9*: 122.
- Brown J.H. (1937)** Appearance of Double-Zone Beta Hemolytic Streptococci in Blood Agar. *J Bacteriol* **34(1)**: 35-48.
- Braun J.S., Sublett J.E., Freyer D., Mitchell T.J., Cleveland J.L., Tuomanen E.I., Weber J.R. (2002)** Pneumococcal pneumolysin and H(2)O(2) mediate brain cell apoptosis during meningitis. *J Clin Invest*.**109(1)**:19-27.
- Bundgaard M. (1984)** The three-dimensional organization of tight junctions in a capillary endothelium revealed by serial-section electron microscopy. *J Ultrastruct Res* **88(1)**: 1-17.
- Burman L.A., Norrby R., Trollfors B. (1985)** Invasive pneumococcal infections: incidence, predisposing factors, and prognosis. *Rev Infect Dis* **7(2)**: 133-42.
- Calbo E., Garau J. (2010)** Of mice and men: innate immunity in pneumococcal pneumonia. *Int J Antimicrob Agents*. **35(2)**:107-13.
- Cámara M., Boulnois G.J., Andrew P.W., Mitchell T.J. (1994)** A neuraminidase from *Streptococcus pneumoniae* has the features of a surface protein. *Infect Immun* **62(9)**: 3688-95.
- Cambien B. and Wagner D.D. (2004)** A new role in hemostasis for the adhesion receptor P-selectin. *Trends Mol Med* **10(4)**: 179-86.
- Cartwright K. (2002)** Pneumococcal disease in western Europe: burden of disease, antibiotic resistance and management. *Eur J Pediatr* **161(4)**: 188-95.
- Catterall J. (1999)** *Streptococcus pneumoniae*. *Thorax* **54**: 929–937.
- Choi K., Kennedy M., Kazarov A., Papadimitriou J.C., Keller G. (1998)** A common precursor for hematopoietic and endothelial cells. *Development* **125(4)**: 725-32.
- Cines D.B., Pollak E.S., Buck C.A., Loscalzo J., Zimmerman G.A., McEver R.P., Pober J.S., Wick T.M., Konkle B.A., Schwartz B.S., Barnathan E.S., McCrae K.R., Hug B.A., Schmidt A.M., Stern D.M. (1998)** Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* **91(10)**: 3527-61.
- Claverys J.P., Martin B., Håvarstein L.S. (2007)** Competence-induced fratricide in streptococci. *Mol Microbiol*.**64(6)**:1423-33.
- Cullere X., Shaw S.K., Andersson L., Hirahashi J., Lusinskas F.W., Mayadas T.N. (2005)** Regulation of vascular endothelial barrier function by Epac, a cAMP-activated exchange factor for Rap GTPase. *Blood* **105(5)**: 1950-5.

- Cundell D., Masure H.R., Tuomanen E.I. (1995)** The molecular basis of pneumococcal infection: a hypothesis. *Clin Infect Dis* **21 Suppl 3**: S204-11.
- Cundell D.R., Gerard C., Idanpaan-Heikkilä I., Tuomanen E.I., Gerard N.P. (1996)** PAF receptor anchors *Streptococcus pneumoniae* to activated human endothelial cells. *Adv Exp Med Biol* **416**: 89-94.
- Cundell D.R., Gerard N.P., Gerard C., Idanpaan-Heikkilä I., Tuomanen E.I. (1995)** *Streptococcus pneumoniae* anchor to activated human cells by the receptor for platelet-activating factor. *Nature* **377(6548)**: 435-8.
- Cunningham M.W. (2000)** Pathogenesis of group A streptococcal infections. *Clin Microbiol Rev.* **13(3)**: 470-511.
- Dave S., Brooks-Walter A., Pangburn M.K., McDaniel L.S. (2001)** PspC, a pneumococcal surface protein, binds human factor H. *Infect Immun* **69(5)**: 3435-7.
- Dinarello C.A. (1988)** Biology of interleukin 1. *FASEB J.* **2(2)**:108-15.
- Dintilhac A., Alloing G., Granadel C., Claverys J.P. (1997)** Competence and virulence of *Streptococcus pneumoniae*: Adc and PsaA mutants exhibit a requirement for Zn and Mn resulting from inactivation of putative ABC metal permeases. *Mol Microbiol* **25(4)**: 727-39.
- Doi Y., Kudo H., Nishino T., Kayashima K., Kiyonaga H., Nagata T., Nara S., Morita M., Fujimoto S. (2001)** Synthesis of calcitonin gene-related peptide (CGRP) by rat arterial endothelial cells. *Histol Histopathol* **16(4)**: 1073-9.
- Dogan S., Zhang Q., Pridmore A.C., Mitchell T.J., Finn A., Murdoch C. (2010)** Pneumolysin-induced CXCL8 production by nasopharyngeal epithelial cells is dependent on calcium flux and MAPK activation via Toll-like receptor 4. *Microbes Infect.* **13(1)**:65-75.
- Dong J.F., Moake J.L., Nolasco L., Bernardo A., Arceneaux W., Shrimpton C.N., Schade A.J., McIntire L.V., Fujikawa K., López J.A. (2002)** ADAMTS-13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood* **100(12)**: 4033-9.
- Donners M.M., Wolfs I.M., Olieslagers S., Mohammadi-Motahhari Z., Tchaikovski V., Heeneman S., van Buul J.D., Caolo V., Molin D.G., Post M.J., Waltenberger J. (2010)** A disintegrin and metalloprotease 10 is a novel mediator of vascular endothelial growth factor-induced endothelial cell function in angiogenesis and is associated with atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **30(11)**: 2188-95.
- Draijer R., Atsma D.E., van der Laarse A., van Hinsbergh V.W. (1995)** cGMP and nitric oxide modulate thrombin-induced endothelial permeability. Regulation via different pathways in human aortic and umbilical vein endothelial cells. *Circ Res* **76(2)**: 199-208.
- Drevets D.A., Sawyer R.T., Potter T.A., Campbell P.A. (1995)** *Listeria monocytogenes* infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect Immun* **63(11)**: 4268-76.
- Efstratiou A. (2000)** Group A streptococci in the 1990s. *J Antimicrob Chemother* **45 Suppl**: 3-12.
- Ekdahl K., Ahlinder I., Hansson H.B., Melander E., Mölsted S., Söderström M., Persson K. (1997)** Duration of nasopharyngeal carriage of penicillin-resistant *Streptococcus pneumoniae*: experiences from the South Swedish Pneumococcal Intervention Project. *Clin Infect Dis* **25(5)**: 1113-7.

- Etingin O.R., Silverstein R.L., Friedman H.M., Hajjar D.P. (1990)** Viral activation of the coagulation cascade: molecular interactions at the surface of infected endothelial cells. *Cell*. **61(4)**:657-62.
- Etingin O.R., Silverstein R.L., Hajjar D.P. (1991)** Identification of a monocyte receptor on herpesvirus-infected endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **88(16)**:7200-3.
- Eto D.S., Jones T.A., Sundsbak J.L., Mulvey M.A. (2007)** Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog*. **3(7)**:100.
- Ewenstein B.M., Warhol M.J., Handin R.I., Pober J.S. (1987)** Composition of the von Willebrand factor storage organelle (Weibel-Palade body) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol* **104(5)**: 1423-33.
- Evans E.A., Calderwood D.A. (2007)** Forces and bond dynamics in cell adhesion. *Science* **316**: 1148-53
- Facklam R. (2002)** What happened to the streptococci: overview of taxonomic and nomenclature changes. *Clin Microbiol Rev* **15(4)**: 613-30.
- Feldman C., Mitchell T.J., Andrew P.W., Boulnois G.J., Read R.C., Todd H.C., Cole P.J., Wilson R. (1990)** The effect of *Streptococcus pneumoniae* pneumolysin on human respiratory epithelium in-vitro. *Microb Pathog* **9(4)**: 275-84.
- Fiedler U. and Augustin H.G. (2006)** Angiopoietins: a link between angiogenesis and inflammation. *Trends Immunol* **27(12)**: 552-8.
- Fiedler U., Reiss Y., Scharpfenecker M., Grunow V., Koidl S., Thurston G., Gale N.W., Witzernath M., Rosseau S., Suttorp N., Sobke A., Herrmann M., Preissner K.T., Vajkoczy P., Augustin H.G. (2006)** Angiopoietin-2 sensitizes endothelial cells to TNF-alpha and has a crucial role in the induction of inflammation. *Nat Med* **12(2)**: 235-9.
- Fine, D. P. (1975)** Pneumococcal type associated variability in alternate complement pathway activation. *Infect. Immun.* **12**: 772-778
- Florey (1966)** The endothelial cell. *Br Med J* **2(5512)**: 487-90.
- Franz A.R., Steinbach G., Kron M., Pohlandt F. (1999)** Reduction of unnecessary antibiotic therapy in newborn infants using interleukin-8 and C-reactive protein as markers of bacterial infections. *Pediatrics* **104(3 Pt 1)**:447-53.
- Federici A.B., Rand J.H., Bucciarelli P., Budde U., van Genderen P.J., Mohri H., Meyer D., Rodeghiero F., Sadler J.E.; Subcommittee on von Willebrand Factor. (2000)** Acquired von Willebrand syndrome: data from an international registry. *Thromb Haemost.* **84(2)**:345-9.
- Fukuhara S., Sakurai A., Sano H., Yamagishi A., Somekawa S., Takakura N., Saito Y., Kangawa K., Mochizuki N.. (2005)** Cyclic AMP potentiates vascular endothelial cadherin-mediated cell-cell contact to enhance endothelial barrier function through an Epac-Rap1 signaling pathway. *Mol Cell Biol* **25(1)**: 136-46.
- Garcia-Leonie M.E., Cercenado E., Rodeno P., Bernaldo de Quiros J.C.L., Martinez-Hernandezet D., Bouza E. (1992)** Susceptibility of *streptococcus pneumoniae* to penicillin: a prospective microbiological and clinical study. *J. Infect. Dis.* **14**: 427-435.
- Garcia-Rodriguez, J. A. and Fresnadillo Martinez M.J. (2002)** Dynamics of nasopharyngeal colonization by potential respiratory pathogens. *J Antimicrob Chemother* **50 Suppl S2**: 59-73.

- Garcia-Vidal C., Ardanuy C., Tubau F., Viasus D., Dorca J., Liñares J., Gudiol F., Carratalà J. (2010)** Pneumococcal pneumonia presenting with septic shock: host- and pathogen-related factors and outcomes. *Thorax*. **65(1)**:77-81.
- Geelen S., Bhattacharyya C., Tuomanen E. (1993)** The cell wall mediates pneumococcal attachment to and cytopathology in human endothelial cells. *Infect Immun* **61(4)**: 1538-43.
- Giblin J.P., Hewlett L.J., Hannah M.J. (2008)** Basal secretion of von Willebrand factor from human endothelial cells. *Blood* **112(4)**: 957-64.
- Goligorsky M.S., Patschan D., Kuo M.C. (2009)** Weibel-Palade bodies-sentinels of acute stress. *Nat Rev Nephrol* **5(7)**: 423-6.
- Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C. Jr. (1979)** Serotypes of *Streptococcus pneumoniae* causing diseases. *J. Infect. Dis.* **140**: 979-983.
- Gray B.M., Converse G.M., Dillon H.C. Jr. (1980)** Epidemiology studies of *Streptococcus pneumoniae* in infants: acquisition, carriage, and infection during the first 24 month of life. *J. Infect. Dis.* **142**: 923-933.
- Griffith, F. (1928)** The Significance of Pneumococcal Types. *J Hyg (Lond)* **27(2)**: 113-59.
- Grimwood K., Collignon P.J., Currie B.J., Ferson M.J., Gilbert G.L., Hogg G.G., Isaacs D., McIntyre P.B. (1997)** Antibiotic management of pneumococcal infections in an era of increased resistance. *J Paediatr Child Health* **33(4)**: 287-95.
- Hahn, Falke, Kaufmann, Ullmann (1999)** Medizinische Mikrobiologie, Springer, 3. Auflage
- Hammerschmidt, S. (2006)** Adherence molecules of pathogenic pneumococci. *Curr Opin Microbiol* **9(1)**: 12-20.
- Hammerschmidt S., Agarwal V., Kunert A., Haelbich S., Skerka C., Zipfel P.F. (2007)** The host immune regulator factor H interacts via two contact sites with the PspC protein of *Streptococcus pneumoniae* and mediates adhesion to host epithelial cells. *J Immunol* **178(9)**: 5848-58.
- Harrison-Lavoie K.J., Michaux G., Hewlett L., Kaur J., Hannah M.J., Lui-Roberts W.W., Norman K.E., Cutler D.F. (2006)** P-selectin and CD63 use different mechanisms for delivery to Weibel-Palade bodies. *Traffic* **7(6)**: 647-62.
- Håvarstein L.S., Martin B., Johnsborg O., Granadel C., Claverys J.P. (2006)** New insights into the pneumococcal fratricide: relationship to clumping and identification of a novel immunity factor. *Mol Microbiol.* **59(4)**:1297-307.
- Henriques-Normark B., Blomberg C., Dagerhamn J., Bättig P., Normark S..** The rise and fall of bacterial clones: *Streptococcus pneumoniae*. *Nat Rev Microbiol.* **6(11)**:827-37.
- Hippenstiel, S. and Suttorp N. (2003)** Interaction of pathogens with the endothelium. *Thromb Haemost* **89(1)**: 18-24.
- Holmes A.R., McNab R., Millsap K.W., Rohde M., Hammerschmidt S., Mawdsley J., Jenkinson H.F. (2001)** The *pavA* gene of *Streptococcus pneumoniae* encodes a fibronectin-binding protein that is essential for virulence. *Mol. Microbiol.* **41(6)**: 1395-1408.
- Holtje J.V., Tomasz A. (1975)** Purification of the pneumococcal N-Acetylmuramyl-L-alanine amidase to biochemical homogeneity. *J. Biol. Chem.* **251**: 4199- 4207.

- Howell G. J., Herbert S. P., Smith J. M., Mittar S., Ewan L. C., Mohammed M., Hunter A. R., Simpson N., Turner A. J., Zachary I. et al. (2004)** Endothelial cell confluence regulates Weibel-Palade body formation. *Mol Membr Biol* **21**: 413-21.
- Into T., Kanno Y., Dohkan J., Nakashima M., Inomata M., Shibata K., Lowenstein C.J., Matsushita K. (2007)** Pathogen recognition by Toll-like receptor 2 activates Weibel-Palade body exocytosis in human aortic endothelial cells. *J Biol Chem* **282(11)**: 8134-41.
- Ishizuka S., Yamaya M., Suzuki T., Nakayama K., Kamanaka M., Ida S., Sekizawa K., and Sasaki H. (2001)** Acid exposure stimulates the adherence of *Streptococcus pneumoniae* to cultured human airway epithelial cells: effects on platelet-activating factor receptor expression. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **24(4)**:459-68.
- Jacobs M.R. (2004)** *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and patterns of resistance. *Am J Med* **117 Suppl 3A**: 3S-15S.
- Jacobson R. M. and Poland G.A. (2002)** The pneumococcal conjugate vaccine. *Minerva Pediatr* **54(4)**: 295-303.
- Jaffe R. and Deykin D. (1974)** Evidence for a structural requirement for the aggregation of platelets by collagen. *J Clin Invest* **53(3)**: 875-83.
- Jedrzejewski, M. J. (2001)** Pneumococcal virulence factors: structure and function. *Microbiol Mol Biol Rev* **65(2)**: 187-207
- Johnson M.K. (1977)** Cellular localisation of pneumolysin. *FEMS Microbiol. Lett.* **2**: 243-245.
- Johnson MK, Geoffroy C, Alouf JE.** Binding of cholesterol by sulfhydryl-activated cytolysins. *Infect Immun.* **1980 Jan**;27(1):97-101.
- Johnston R.B., Jr. (1991)** Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Rev. Infect. Dis.* **13**: 509-517.
- Kayser, Eckert, Zinkernagel (1997)** Medizinische Mikrobiologie. Thieme-Verlag. 9. Auflage.
- Kirschning C. J. and Schumann R.R. (2002)** TLR2: cellular sensor for microbial and endogenous molecular patterns. *Curr Top Microbiol Immunol* **270**: 121-44.
- Klein D.L. (1999)** Pneumococcal Disease and the role of conjugate vaccines. *Microb. Drug Resist.* **5(2)**: 147-157.
- Knuf, M. und D. Kieninger. 2010.** Neue Pneumokokken-Konjugatimpfstoffe. Schattauer, KinderundJugendmedizin.**10**: 145-149.
- Kobayashi M., Inoue K., Warabi E., Minami T., Kodama T. (2005)** A simple method of isolating mouse aortic endothelial cells. *J Atheroscler Thromb* **12(3)**: 138-42.
- Kostrzynska M, Wadström T. (2002)** Binding of laminin, type IV collagen, and vitronectin by *Streptococcus pneumoniae*. *Zentralbl Bakteriol.* **277(1)**:80-3.
- Krüll M., Klucken A.C., Wuppermann F.N., Fuhrmann O., Magerl C., Seybold J., Hippenstiel S., Hegemann J.H., Jantos C.A., Suttrop N. (1999)** Signal transduction pathways activated in endothelial cells following infection with *Chlamydia pneumoniae*. *J Immunol* **162(8)**: 4834-41.

- Kukavica-Ibrulj I., Hamelin M.E., Prince G.A., Gagnon C., Bergeron Y., Bergeron M.G., Boivin G. (2009)** Infection with human metapneumovirus predisposes mice to severe pneumococcal pneumonia. *J Virol* **83**(3): 1341-9.
- Lancefield R.C. (1928)** The antigenic complex of streptococcus haemolyticus. A Demonstration of a type specific substance in extracts of streptococcus haemolyticus. *J Exp Med* **47**: 91-103.
- Lancefield R. C. (1933)** A Serological Differentiation of Human and Other Groups of Hemolytic Streptococci. *J Exp Med* **57**(4): 571-95.
- Laterre P.F., Garber G., Levy H., Wunderink R., Kinasewitz G.T., Sollet J.P., Maki D.G., Bates B., Yan S.C., Dhainaut J.F. (2005)** Severe community-acquired pneumonia as a cause of severe sepsis: data from the PROWESS study. *Crit Care Med* **33**: 952–961.
- Lähteenmäki K., Kuusela P., Korhonen T.K. (2001)** Bacterial plasminogen activators and receptors. *FEMS Microbiol Rev.* **25**(5): 531-52.
- Lee C.J., Banks S.D., Li J.P. (1991)** Virulence, immunity, and vaccine related to *Streptococcus pneumoniae*. *Crit Rev Microbiol* **18**(2): 89-114.
- Lin J., Tsuboi Y., Pan W., Giebink G.S., Adams G.L., Kim Y. (2002)** Analysis by cDNA microarrays of altered gene expression in middle ears of rats following pneumococcal infection. *Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.* **65**:203–211.
- Lock R.A., Paton J.C., Hansman D. (1988)** Comparative efficacy of pneumococcal neuraminidase and pneumolysin as immunogens protective against *Streptococcus pneumoniae*. *Microb. Pathog.***5**: 461-467.
- Loda F.A., Collier A.M., Glezen W.P., Strangert K., Clyde W.A. Jr, Denny F.W. (1975)** Occurrence of *Diplococcus pneumoniae* in the upper respiratory tract of children. *J Pediatr* **87**(6 Pt 2): 1087-93.
- Lowenstein C.J., Morrell C.N., Yamakuchi M. (2005)** Regulation of Weibel-Palade body exocytosis. *Trends Cardiovasc Med* **15**(8): 302-8.
- Lund E., Henrichsen J. (1987)** Laboratory diagnosis, serology and epidemiology of *Streptococcus pneumoniae*. Bergan T., Norris J.R., eds. Methods in microbiology. Vol. **12** New York: AcademicPress; 241-261.
- Lynch D.C., Zimmerman T.S., Kirby E.P., Livingston D.M. (1983)** Subunit composition of oligomeric human von Willebrand factor. *J Biol Chem* **258**(21): 12757-60.
- Lynch J.P. 3rd and Zhanel G. G. (2010)** *Streptococcus pneumoniae*: epidemiology and risk factors, evolution of antimicrobial resistance, and impact of vaccines. *Curr Opin Pulm Med* **16**(3): 217-25.
- Madigan M.T., Martinko J. M., Parker J. (2003)** Brock Mikrobiologie. Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg. 2. Nachdruck
- Madsen M., Lebenthal Y., Cheng Q., Smith B.L., Hostetter M.K. (2000)** A pneumococcal protein that elicits interleukin-8 from pulmonary epithelial cells. *J Infect Dis* **181**(4): 1330-6.
- Majno G. and Palade G. E. (1961)** Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* **11**: 571-605.

- Marrie T. (1999)** Pneumococcal pneumonia: epidemiology and clinical features. *Semin. Respir. Infect.* **14**:227.
- Marriott H.M., Mitchell T.J., Dockrell D.H. (2008)** Pneumolysin: a double-edged sword during the host-pathogen interaction. *Curr Mol Med* **8**(6): 497-509.
- Marti T., Rösselet S.J., Titani K., Walsh K.A. (1987)** Identification of disulfide-bridged substructures within human von Willebrand factor. *Biochemistry* **26**(25): 8099-109.
- Maurer P.P., Zbinden R., Kaufmann C., Thiel M.A. (2007)** Antibiotic susceptibilities of bacteria isolated from ophthalmic specimens between 1984 and 2005 in Zurich, Switzerland. *Klin Monbl Augenheilkd.* **224**(4):240-3.
- Mayadas T.N., Johnson R.C., Rayburn H., Hynes R.O., Wagner D.D. (1993)** Leukocyte rolling and extravasation are severely compromised in P selectin-deficient mice. *Cell* **74**(3): 541-554.
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. (1989)** GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* **84**(1): 92-9.
- Metcalf D.J., Nightingale T.D., Zenner H.L., Lui-Roberts W.W., Cutler D.F. (2008)** Formation and function of Weibel-Palade bodies. *J Cell Sci* **121**(Pt 1): 19-27.
- Michaux G. and Cutler D. F. (2004)** How to roll an endothelial cigar: the biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Traffic* **5**(2): 69-78.
- Miller R.C., Pelton J.T., Huggins J.P. (1993)** Endothelins--from receptors to medicine. *Trends Pharmacol Sci* **14**(2): 54-60.
- Mitchell T.J. (2000)** Virulence factors and the pathogenesis of disease caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Res Microbiol* **151**(6): 413-9.
- Mitchell T. J. (2003)** The pathogenesis of streptococcal infections: from tooth decay to meningitis. *Nat Rev Microbiol* **1**(3): 219-30.
- Moll K.J. (2006)** Anatomie. Elsevier GmbH, Urban & fischer Verlag, 18. Auflage, S. 139-146.
- Musher D.M. (1992)** Infections caused by *Streptococcus pneumoniae*: clinical spectrum, pathogenesis, immunity, and treatment. *Clin Infect Dis.* **14**(4):801-7.
- Nassif X., Bourdoulous S., Eugène E., Couraud P.O. (2002)** How do extracellular pathogens cross the blood-brain barrier? *Trends Microbiol* **10**(5): 227-32.
- Nelson A.L., Roche A.M., Gould J.M., Chim K., Ratner A.J., Weiser J.N. (2007)** Capsule enhances pneumococcal colonization by limiting mucus-mediated clearance. *Infect Immun.* **75**(1):83-90.
- Neufeld F. (1902)** Über die Agglutination der Pneumokokken und über die Theorie der Agglutination. *Z Hyg Infektionskr* **40**: 54-72.
- Newman P. J. (1994)** The role of PECAM-1 in vascular cell biology. *Ann N Y Acad Sci* **714**: 165-74.
- Newman P. J. (1997)** The biology of PECAM-1. *J Clin Invest.* **99**(1): 3-8.

- Nichols W.L., Hultin M.B., James A.H., Manco-Johnson M.J., Montgomery R.R., Ortel T.L., Rick M.E., Sadler J.E., Weinstein M., Yawn B.P. (2008)** von Willebrand disease (VWD): evidence-based diagnosis and management guidelines, the National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Expert Panel report (USA). *Haemophilia*. 2008 Mar;**14(2)**:171-232.
- Nielsen S.V. and Henrichsen J. (1996)** Incidence of invasive pneumococcal disease and distribution of capsular types of pneumococci in Denmark, 1989-94. *Epidemiol Infect* **117(3)**: 411-6.
- Nightingale T.D., Pattni K., Hume A.N., Seabra M.C., Cutler D.F. (2009)** Rab27a and MyRIP regulate the amount and multimeric state of VWF released from endothelial cells. *Blood* **113(20)**: 5010-8.
- Nolte (2009)** Lexikon der Infektionskrankheiten des Menschen. Springer Verlag, 3. Auflage, S.779-783.
- Novak R. and Tuomanen E. (1999)** Pathogenesis of pneumococcal pneumonia. *Semin Respir Infect* **14**: 209–217.
- Nuorti J. P. and Whitney C. G. (2010)** Prevention of pneumococcal disease among infants and children-use of 13-valent pneumococcal conjugate vaccine and 23-valent pneumococcal polysaccharide vaccine - recommendations of the Advisory Committee on Immunization Practices (ACIP). *MMWR Recomm Rep* **59(RR-11)**: 1-18.
- O'Brien K.L., Wolfson L.J., Watt J.P., Henkle E., Deloria-Knoll M., McCall N., Lee E., Mulholland K., Levine O.S., Cherian T. (2009)** Burden of disease caused by *Streptococcus pneumoniae* in children younger than 5 years: global estimates. *Lancet* **374**: 893–902.
- Orihuela C.J., Mahdavi J., Thornton J., Mann B., Wooldridge K.G., Abouseada N., Oldfield N.J., Self T, Ala'Aldeen D.A., Tuomanen E.I. (2009)** Laminin receptor initiates bacterial contact with the blood brain barrier in experimental meningitis models. *J Clin Invest*. **119(6)**:1638-46.
- Øynebråten I., Bakke O., Brandtzaeg P., Johansen F.E., Haraldsen G. (2004)** Rapid chemokine secretion from endothelial cells originates from 2 distinct compartments. *Blood* **104(2)**: 314-20.
- Ozaka T., Doi Y., Kayashima K., Fujimoto S. (1997)** Weibel-Palade bodies as a storage site of calcitonin gene-related peptide and endothelin-1 in blood vessels of the rat carotid body. *Anat Rec* **247(3)**: 388-94.
- Paton, J. C., and Ferrante, A. (1983).** Inhibition of human polymorphonuclear leukocyte respiratory burst, bactericidal activity, and migration by pneumolysin. *Infect. Immun.* **41**: 1212- 1216
- Paton J.C., Andrew P.W., Boulnois G.J., Mitchell T.J. (1993)** Molecular analysis of the pathogenicity of *Streptococcus pneumoniae*: the role of pneumococcal proteins. *Annu Rev Microbiol* **47**: 89-115.
- Partanen T.A., Paavonen K. (2001)** Lymphatic versus blood vascular endothelial growth factors and receptors in humans. *Microsc Res Tech.* **55(2)**:108-21.
- Patterson M.J. (1996)** Streptococcus. in: Baron S. SourceMedical Microbiology. 4th edition. Galveston (TX): University of Texas Medical Branch at Galveston; **1996**. Kapitel13.

Pelzer (2009) Skript zum Seminar Mikro- und Makrovasculäre Endothelzellen. Promocell, Heidelberg, 24.04.09

Plaimauer B., Zimmermann K., Völkel D., Antoine G., Kerschbaumer R., Jenab P., Furlan M., Gerritsen H., Lämmle B., Schwarz H.P., Scheifflinger F. (2002) Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood* **100(10)**: 3626-32.

Pletz M.W., Maus U., Krug N., Welte T., Lode H. (2008) Pneumococcal vaccines: mechanism of action, impact on epidemiology and adaption of the species. *Int J Antimicrob Agents* **32(3)**: 199-206.

PneumoWeb, Laborsurveillance invasiver Pneumokokken-Erkrankungen am Robert Koch-Institut (http://www.rki.de/cln_169/nn_494678/DE/Content/Infekt/Sentinel/Pneumoweb/Pneumoweb__node.html?__nnn=true)

Pneumovax 23 <http://www.merckvaccines.com/Products/pneumovax23/Pages/home.aspx>

Pober J.S. (1987) Effects of tumour necrosis factor and related cytokines on vascular endothelial cells. *Ciba Found Symp* **131**: 170–184.

Podgrabinska S., Braun P., Velasco P., Kloos B., Pepper M.S., Skobe M. (2002) Molecular characterization of lymphatic endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **99(25)**:16069-74.

Poland G.A. (1999) The burden of pneumococcal disease: the role of conjugate vaccines. *Vaccine* **17(13-14)**: 1674-9.

Posfay-Barbe K. M. and Wald E. R. (2004) Pneumococcal vaccines: do they prevent infection and how? *Curr Opin Infect Dis* **17(3)**: 177-84.

Prato R., Tafuri S., Fortunato F., Martinelli D. (2010) Why it is still important that countries know the burden of pneumococcal disease. *Hum Vaccin* **6(11)**: 918-21.

Preissner K.T., Rötter J., Selmayr E., Fasold H., Müller-Berghaus G.(1985) Influence of fibrinogen on fibrin polymerization. Ultracentrifugation studies. *Biochim Biophys Acta*. **829(3)**:358-64.

Preissner K.T. (1988) Anticoagulant potential of endothelial cell membrane components. Haemostasis. **18(4-6)**:271-300.

Preissner K.T., Chhatwal G.S. (1999) Extracellular matrix (ECM) and host cell surfaces: Potential sites of pathogen interaction. In: *Cellular microbiology*, ed. P. Cossar et al., ASM Press, Washington DC, pp.49-65.

Preissner K.T., Nawroth P.P., Kanse S.M. (2000) Vascular protease receptors: integrating haemostasis and endothelial cell functions. *J Pathol*. **190(3)**:360-72.

Pries A. R. and Kuebler W. M. (2006) Normal endothelium. *Handb Exp Pharmacol* (**176 Pt 1**): 1-40.

Pries A.R., Secomb T.W., Gaehtgens P. (2000) The endothelial surface layer. *Pflügers Arch* **440(5)**: 653-66.

Privratsky J.R., Paddock C.M., Florey O., Newman D.K., Muller W.A., Newman P.J. (2011) Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity. *J Cell Sci*. **124(Pt 9)**:1477-85.

- Purvis A. R. and Sadler J. E. (2004)** A covalent oxidoreductase intermediate in propeptide-dependent von Willebrand factor multimerization. *J Biol Chem* **279(48)**: 49982-8.
- Pusztaszeri M.P., Seelentag W., Bosman F.T. (2006)** Immunohistochemical Expression of Endothelial Markers CD31, CD34, von Willebrand Factor, and Fli-1 in Normal Human Tissues. *J Histochem Cytochem.* **54(4)**:385-95.
- Reinert R.R. (2009)** The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect* **15 Suppl 3**: 7-11.
- Reinert R.R., Queck A., Kaufhold A., Kresken M., Lütticken R. (1995)** Antimicrobial resistance and type distribution of *Streptococcus pneumoniae* isolates causing systemic infections in Germany, 1992-1994. *Clin Infect Dis* **21(6)**: 1398-401.
- Reinert R.R., Reinert S., van der Linden M., Cil M.Y., Al-Lahham A., Appelbaum P. (2005)** Antimicrobial susceptibility of *Streptococcus pneumoniae* in eight European countries from 2001 to 2003. *Antimicrob Agents Chemother* **49(7)**: 2903-13.
- Reinert R.R.(2009)** The antimicrobial resistance profile of *Streptococcus pneumoniae*. *Clin Microbiol Infect.* **15** Suppl 3:7-11.
- Rennels M.B., Edwards K.M., Keyserling H.L., Reisinger K.S., Hogerman D.A., Madore D.V., Chang I., Paradiso P.R., Malinoski F.J., Kimura A. (1998)** Safety and Immunogenicity of heptavalent pneumococcal Vaccine conjugated to CRM197 in United States infants. *Pediatrics* **101**: 604-611.
- Rijneveld A.W., van den Dobbelsteen G.P., Florquin S., Standiford T.J., Speelman P., van Alphen L., van der Poll T. (2002)** Roles of interleukin-6 and macrophage inflammatory protein-2 in pneumolysin-induced lung inflammation in mice. *J Infect Dis* **185**: 123–126.
- Ring A., Weiser J.N., Tuomanen E.I. (1998)** Pneumococcal trafficking across the blood-brain barrier. *J Clin Invest* **102**: 347–360.
- Robert-Koch-Institut.** Epidemiologischen Bulletin 13. Juli 2001/Nr. 28
- Robert Koch-Institut.** Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am RKI. Stand: Juli 2010. Epidemiologisches Bulletin 2010;30:279-298.
- Rodgers G.L., Arguedas A., Cohen R., Dagan R. (2009)** Global serotype distribution among *Streptococcus pneumoniae* isolates causing otitis media in children: potential implications for pneumococcal conjugate vaccines. *Vaccine* **27(29)**: 3802-10.
- Rogers P.D., Thornton J., Barker K.S., McDaniel D.O., Sacks G.S., Swiatlo E., McDaniel L.S. (2003)** Pneumolysin-dependent and -independent gene expression identified by cDNA microarray analysis of THP-1 human mononuclear cells stimulated by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect. Immun.* **71**:2087–2094.
- Romani de Wit T., de Leeuw H.P., Rondaij M.G., de Laaf R.T., Sellink E., Brinkman H.J., Voorberg J., van Mourik J.A. (2003)** Von Willebrand factor targets IL-8 to Weibel-Palade bodies in an endothelial cell line. *Exp Cell Res* **286(1)**: 67-74.
- Romani de Wit T., Rondaij M.G., van Mourik J.A. (2004)** Weibel-Palade bodies: unique secretory organelles within endothelial cells. *Ned Tijdschr Geneeskde* **148(32)**: 1572-7.
- Rondaij M.G., Bierings R., Kragt A., van Mourik J.A., Voorberg J. (2006)** Dynamics and plasticity of Weibel-Palade bodies in endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **26(5)**: 1002-7.

- Rose L., Shivshankar P., Hinojosa E., Rodriguez A., Sanchez C.J., Orihuela C.J. (2008)** Antibodies against PsrP, a novel *Streptococcus pneumoniae* adhesin, block adhesion and protect mice against pneumococcal challenge. *J Infect Dis* **198(3)**: 375-83.
- Rosenow C., Ryan P., Weiser J.N., Johnson S., Fontan P., Ortqvist A., Masure H.R. (1997)** Contribution of novel choline-binding proteins to adherence, colonization and immunogenicity of *Streptococcus pneumoniae*. *Mol Microbiol.* **25(5)**:819-29.
- Rubins J.B., Duane P.G., Clawson D., Charboneau D., Young J., Niewoehner D.E. (1993)** Toxicity of pneumolysin to pulmonary alveolar epithelial cells. *Infect Immun.***61(4)**:1352-8.
- Rubins J.B., Paddock A.H., Charboneau D., Berry A.M., Paton J.C., Janoff E.N. (1998)** Pneumolysin in pneumococcal adherence and colonization. *Microb Pathog.* **25(6)**:337-42.
- Rückinger S, van der Linden M, Reinert RR, von Kries R, Burckhardt F, Siedler A. (2009)** Reduction in the incidence of invasive pneumococcal disease after general vaccination with 7-valent pneumococcal conjugate vaccine in Germany. *Vaccine* **27(31)**: 4136-41.
- Ruggeri Z. M. (1997)** von Willebrand factor. *J Clin Invest* **100(11 Suppl)**: S41-6.
- Ruggeri Z. M. (2007)** Von Willebrand factor: looking back and looking forward. *Thromb Haemost* **98(1)**: 55-62.
- Sadler J. E. (1998)** Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem* **67**: 395-424.
- Sadler J. E. (2003)** Von Willebrand disease type 1: a diagnosis in search of a disease. *Blood* **101(6)**: 2089-93.
- Sadler J. E. (2005)** von Willebrand factor: two sides of a coin. *J Thromb Haemost* **3(8)**: 1702-9.
- Sadler J. E. (2009)** Low von Willebrand factor: sometimes a risk factor and sometimes a disease. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program*: 106-12.
- Sadler J. E. and Rodeghiero F. (2005)** Provisional criteria for the diagnosis of VWD type 1. *J Thromb Haemost* **3(4)**: 775-7.
- Saksela O. (1985)** Plasminogen activation and regulation of pericellular proteolysis. *Biochim Biophys Acta.* Nov 12;**823(1)**:35-65.
- Sandgren A., Albiger B., Orihuela C.J., Tuomanen E., Normark S., Henriques-Normark B. (2005)** Virulence in mice of pneumococcal clonal types with known invasive disease potential in humans. *J Infect Dis.* **192(5)**:791-800.
- Sankilampi U., Herva E., Haikala R., Liimatainen O., Renkonen V., Leinonen M. (1997)** Epidemiology of invasive *Streptococcus pneumoniae* infections in adults in Finland. *Epidemiol. Infect.* **118**: 7-15.
- Salyers A.A., Whitt D.D. (1994)** Bacterial pathogenesis: a molecular approach, ASM Press, Washington D.C.
- Seeger W, Walter H, Neuhofer H, Suttrop N, Bhakdi S. (1989)** *Escherichia coli* hemolysin causes thromboxane-mediated hypertension and vascular leakage in rabbit lungs. *Prog Clin Biol Res* **308**: 67-72.

- Seki M, Higashiyama Y, Tomono K, Yanagihara K, Ohno H, Kaneko Y, Izumikawa K, Miyazaki Y, Hirakata Y, Mizuta Y, Tashiro T, Kohno S. (2004)** Acute infection with influenza virus enhances susceptibility to fatal pneumonia following *Streptococcus pneumoniae* infection in mice with chronic pulmonary colonization with *Pseudomonas aeruginosa*. *Clin Exp Immunol* **137(1)**: 35-40.
- Silverman D.J., Bond S.B. (1984)** Infection of human vascular endothelial cells by *Rickettsia rickettsii*. *J Infect Dis* **149**:201.
- Silverman D.J. (1984)** *Rickettsia rickettsii*-induced cellular injury of human vascular endothelium in-vitro. *Infect Immun* **44**:545.
- Sinha B., François P.P., Nüsse O., Foti M., Hartford O.M., Vaudaux P., Foster T.J., Lew D.P., Herrmann M., Krause K.H. (1999)** Fibronectin-binding protein acts as *Staphylococcus aureus* invasin via fibronectin bridging to integrin $\alpha 5 \beta 1$. *Cell Microbiol.* **1**: 101-117.
- Sinha B, Francois P, Que YA, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M. (2000)** Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infect Immun* **68(12)**: 6871-8.
- Smith B. L. and Hostetter M. K. (2000)** C3 as substrate for adhesion of *Streptococcus pneumoniae*. *J Infect Dis* **182(2)**: 497-508.
- Sporn L.A., Marder V.J., Wagner D.D. (1986)** Inducible secretion of large, biologically potent von Willebrand factor multimers. *Cell* **46(2)**: 185-90.
- Sporn L.A., Shi R.J., Lawrence S.O., Silverman D.J., Marder V.J. (1991)** *Rickettsia rickettsii* infection of cultured endothelial cells induces release of large von Willebrand Factor multimers from Weibel-Palade bodies. *Blood* **78(10)**: 2595-2602.
- Stamler J.S., Loh E., Roddy M.A., Currie K.E., Creager M.A. (1994)** Nitric oxide regulates basal systemic and pulmonary vascular resistance in healthy humans. *Circulation* **89(5)**: 2035-40.
- Steinfurt C., Wilson R., Mitchell T., Feldman C., Rutman A., Todd H., Sykes D., Walker J., Saunders K., Andrew P.W. (1989)** Effect of *Streptococcus pneumoniae* on human respiratory epithelium in-vitro. *Infect Immun* **57(7)**: 2006-13.
- Stollerman G. H. (1997)** Rheumatic fever. *Lancet* **349(9056)**: 935-42.
- Sumpio B.E., Riley J.T., Dardik A. (2002)** Cells in focus: endothelial cell. *Int J Biochem Cell Biol* **34(12)**: 1508-12.
- Suttorp N., Flöer B., Schnittler H., Seeger W., Bhakdi S. (1990)** Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect Immun* **58(11)**: 3796-801.
- Takeda, K. and Akira S. (2004)** TLR signaling pathways. *Semin Immunol* **16(1)**: 3-9.
- Talay S.R., Valentin-Weigand P., Jerlström P.G., Timmis K.N., Chhatwal G.S. (1992)** Fibronectin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*: sequence of the binding domain involved in adherence of streptococci to epithelial cells. *Infect Immun* **60(9)**: 3837-44.
- Talbot U.M., Paton A.W., Paton J.C. (1996)** Uptake of *Streptococcus pneumoniae* by respiratory epithelial cells. *Infect Immun* **64(9)**: 3772-7.
- Tan T. Q. (2002)** Update on pneumococcal infections of the respiratory tract. *Semin Respir Infect* **17(1)**: 3-9.

- Titani K., Kumar S., Takio K., Ericsson L.H., Wade R.D., Ashida K., Walsh K.A., Chopek M.W., Sadler J.E., Fujikawa K. (1986)** Amino acid sequence of human von Willebrand factor. *Biochemistry* **25**(11): 3171-84.
- Tuomanen E.I., Austrian R., Masure H.R. (1995)** Pathogenesis of pneumococcal infection. *N Engl J Med* **332**(19): 1280-4.
- Uchiyama S., Carlin A.F., Khosravi A., Weiman S., Banerjee A., Quach D., Hightower G., Mitchell T.J., Doran K.S., Nizet V. (2009)** The surface-anchored NanA protein promotes pneumococcal brain endothelial cell invasion. *J Exp Med* **206**(9): 1845-52.
- Valbuena G., Feng H.M., Walker D.H. (2002)** Mechanisms of immunity against rickettsiae. New perspectives and opportunities offered by unusual intracellular parasites. *Microbes Infect* **4**(6): 625-33.
- Valentijn K.M., Sadler J.E., Valentijn J.A., Voorberg J., Eikenboom J. (2011)** Functional architecture of Weibel-Palade bodies. *Blood*. **117**(19):5033-43
- Valentijn K.M., Valentijn J.A., Jansen K.A., Koster A.J. (2008)** A new look at Weibel-Palade body structure in endothelial cells using electron tomography. *J Struct Biol* **161**(3): 447-58.
- Valentijn K.M., van Driel L.F., Mourik M.J., Hendriks G.J., Arends T.J., Koster A.J., Valentijn J.A. (2010)** Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells. *Blood* **116**(10): 1807-16.
- van den Eijnden-Schrauwen Y, Atsma DE, Lupu F, de Vries RE, Kooistra T, Emeis JJ. (1997)** Involvement of calcium and G proteins in the acute release of tissue-type plasminogen activator and von Willebrand factor from cultured human endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **17**(10): 2177-87.
- Vischer U.M., Barth H., Wollheim C.B. (2000)** Regulated von Willebrand factor secretion is associated with agonist-specific patterns of cytoskeletal remodeling in cultured endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **20**(3): 883-91.
- Vischer U.M., Ingerslev J., Wollheim C.B., Mestries J.C., Tsakiris D.A., Haefeli W.E., Kruithof E.K. (1997)** Acute von Willebrand factor secretion from the endothelium in vivo: assessment through plasma propeptide (vWf:AgII) Levels. *Thromb Haemost* **77**(2): 387-93.
- Vischer U. M. and Wagner D. D. (1993)** CD63 is a component of Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Blood* **82**(4): 1184-91.
- Vischer U. M. and Wagner D. D. (1994)** von Willebrand factor proteolytic processing and multimerization precede the formation of Weibel-Palade bodies. *Blood* **83**(12): 3536-44.
- Visser M.R., Tracy P.B., Vercellotti G.M., Goodman J.L., White J.G., Jacob H.S. (1988)** Enhanced thrombin generation and platelet binding on herpes simplex virus-infected endothelium. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **85**(21):8227-30.
- Voorberg J., Fontijn R., Calafat J., Janssen H., van Mourik J.A., Pannekoek H. (1991)** Assembly and routing of von Willebrand factor variants: the requirements for disulfide-linked dimerization reside within the carboxy-terminal 151 amino acids. *J Cell Biol* **113**(1): 195-205.
- Voyta J.C., Via D.P., Butterfield C.E., Zetter B.R. (1984)** Identification and isolation of endothelial cells based on their increased uptake of acetylated-low density lipoprotein. *J Cell Biol* **99**(6): 2034-40.
- Wagner D.D., Olmsted J.B., Marder V.J. (1982)** Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*. **95**(1):355-60.

- Wagner D.D., Marder V.J. (1983)** Biosynthesis of von Willebrand protein by human endothelial cells. Identification of a large precursor polypeptide chain. *J Biol Chem.* **258(4)**:2065-7.
- Wagner D.D., Fay P.J., Sporn L.A., Sinha S., Lawrence S.O., Marder V.J. (1987)** Divergent fates of von Willebrand factor and its propolypeptide (von Willebrand antigen II) after secretion from endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84(7)**: 1955-9.
- Wagner D. D. (1990)** Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* **6**: 217-46.
- Walker D.H., Firth W.T., Edgell C.J. (1982)** Human endothelial cell culture plaques induced by *Rickettsia rickettsii*. *Infect Immunol* **37**:301.
- Watson D.A., Musher D.M., Verhoef J. (1995)** Pneumococcal virulence factors and host immune responses to them. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis* **14(6)**: 479-90.
- Weibel E. R. and Palade G. E. (1964)** New Cytoplasmic Components in Arterial Endothelia. *J Cell Biol* **23**: 101-12.
- W. H. O. (2005)** State of the art of vaccine research and development. Initiative for Vaccine Research.
- WHO (World Health Organisation). (2007)** Pneumococcal conjugate vaccine for childhood immunization - World Health Organization position paper. *Weekly epidemiological report* **82**: 93-104.
- Yamamoto K., de Waard V., Fearn C., Loskutoff D.J. (1998)** Tissue distribution and regulation of murine von Willebrand factor gene expression in vivo. *Blood* **92(8)**: 2791-801.
- Yother, J., and White, J. M. (1994)** Novel surface attachment mechanism of the *Streptococcus pneumoniae* Protein PspA. *J. Bacteriol.* **176**: 2976-2985
- Zannettino A.C., Holding C.A., Diamond P., Atkins G.J., Kostakis P., Farrugia A., Gamble J., To L.B., Findlay D.M., Haynes D.R. (2005)** Osteoprotegerin (OPG) is localized to the Weibel-Palade bodies of human vascular endothelial cells and is physically associated with von Willebrand factor. *J Cell Physiol* **204(2)**: 714-23.
- Zenner H.L., Collinson L.M., Michaux G., Cutler D.F. (2007)** High-pressure freezing provides insights into Weibel-Palade body biogenesis. *J Cell Sci* **120(Pt 12)**: 2117-25.
- Zhang J.R., Mostov K.E., Lamm M.E., Nanno M., Shimida S., Ohwaki M., Tuomanen E. (2000)** The polymeric immunoglobulin receptor translocates pneumococci across human nasopharyngeal epithelial cells. *Cell* **102(6)**: 827-37.
- Zysk G., Schneider-Wald B.K., Hwang J.H., Bejo L., Kim K.S., Mitchell T.J., Hakenbeck R., Heinz H.P. (2001)** Pneumolysin is the main inducer of cytotoxicity to brain microvascular endothelial cells caused by *Streptococcus pneumoniae*. *Infect Immun* **69(2)**: 845-52.

Danksagung

Die vorliegende Dissertation wurde in der Abteilung Medizinische Mikrobiologie des Helmholtz-Zentrums für Infektionsforschung unter Leitung von Prof. Dr. G. S. Chhatwal durchgeführt.

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. G. S. Chhatwal für die Möglichkeit meine Dissertation in der Arbeitsgruppe Medizinische Mikrobiologie anfertigen zu können.

Ganz besonders bedanke ich mich bei PD Dr. Simone Bergmann für die Übernahme des Referates und die interessante Themenstellung, die engagierte und umfassende Betreuung dieser Arbeit, sowie die vielen Anregungen und Diskussionen, die wesentlich zur Anfertigung dieser Arbeit beigetragen haben.

Bedanken möchte ich mich auch bei Prof. Dr. Katharina Riedel für die Übernahme des zweiten Referats.

Darüber hinaus geht mein Dank an Dr. Andreas Nerlich für die Hilfestellung und Unterstützung in allen Belangen der Mikroskopie und Bildbearbeitung.

Dr. Robert Geffers und Petra Hagendorff von der Arbeitsgruppe Genomanalytik des Helmholtz Zentrums für Infektionsforschung danke ich für die experimentelle Durchführung und Unterstützung bei der Auswertung der Microarray- und Real time PCR-Analysen.

Des Weiteren möchte ich Prof. Dr. Manfred Rohde und Ina Schleicher für die Anfertigung der elektronenmikroskopischen Aufnahmen, sowie Astrid Dröge für die Durchführung der Real time PCR-Analysen und der Pneumokokkenmembranprotein-Präparation danken.

Bedanken möchte ich mich an dieser Stelle auch bei den Mitgliedern der Abteilungen Medizinische Mikrobiologie und Infektionsimmunologie für das angenehme Arbeitsklima und die Hilfsbereitschaft im Laboralltag. Meinem Kollegen Dr. Marcus Fulde, Angela Hitzmann und Astrid Dröge danke ich für zahlreiche praktische Hinweise und hilfreiche Diskussionen. Mein Dank geht ebenso an Dr. Daniel Patric Nitsche-Schmitz, Dr. Susanne Talay, Katja Mummenbrauer und Melanie Tillig, die für jedes Problem ein offenes Ohr hatten.

Ganz besonders bedanken möchte ich mich bei Nina Janze, Dr. Silvana Reißmann, Dr. René Bergmann, Angela Hitzmann, Silva Amelung, Nadine Nachtigall, Katja Branitzki-Heinemann, Anja Grützner, Andreas Raschka und Franziska Voigt für die familiäre Atmosphäre und den vielen hilfreichen Gesprächen in- und außerhalb des Labors.

Mein ganz persönlicher Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für den verständnisvollen Rückhalt und die Unterstützung während meines Studiums und meiner Promotion. Sandra danke ich ganz besonders für ihre Geduld und ihr Verständnis über all die Jahre hinweg.